

N° d'ordre : 2594

THESE

Présentée pour obtenir

LE TITRE DE DOCTEUR DE L'INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE TOULOUSE

École doctorale : Sciences de la Matière

Spécialité : Sciences des Agroressources

Par M Geoffrey-Thibault PERCHET

Titre de la thèse

**ETUDE DE BIOREMEDIATION DE SEDIMENTS
CONTAMINES PAR DES COMPOSES
ORGANQUES NITRES PERSISTANTS**

Soutenue le 14 février 2008 devant le jury composé de :

M	HAFIDI Mohammed	Rapporteur
M	DURAN Robert	Rapporteur
Mme	PATUREAU Dominique	Membre
M	LAURENT François	Membre invité
M	MERLINA Georges	Membre
M	REVEL Jean-Claude	Co-directeur de thèse
M	PINELLI Eric	Directeur de thèse

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier **Robert Duran** de l'IPREM-EEM de Pau pour avoir présidé ce jury et également avoir évalué ce travail en tant que rapporteur. Je tiens également à remercier **Mohamed Hafidi** de l'Université de Marrakech pour avoir apporté une critique constructive à cette thèse. Je tiens également à remercier **Dominique Patureau** du laboratoire de biologie et environnement de l'INRA de Narbonne pour avoir contribué à améliorer la qualité de ce travail. Je remercie également **François Laurent** de l'UMR Xénobiotiques de l'INRA de Saint Martin du Touch pour m'avoir permis de travailler en collaboration avec son laboratoire. Je lui suis reconnaissant d'avoir bien voulu participer à ce jury. Je tiens également à remercier le professeur **Eric Pinelli**, mon directeur de thèse pour m'avoir soutenu durant ces 4 années de thèse et m'avoir fait confiance depuis le DEA. J'ai partagé avec lui des moments riches en science, riches en conseils qui m'ont guidé et me guideront encore longtemps. Mais également des moments riches en sensations grâce aux sorties VTT que j'ai eu la chance de faire avec lui. Merci pour m'avoir retiré les épines une par une quand j'étais paralysé dans les ronces après les chutes... J'aimerais aussi remercier le professeur **Jean-Claude Revel** pour m'avoir guidé dans les méandres de la science grâce à son expérience, et sa sagesse pour rédiger les rapports...

Merci à **Georges Merlina** pour m'avoir appris à démonter les HPLC, les spectromètres de masse, et les générateurs d'azote et les remonter comme des puzzles, et m'avoir prêté son téléphone à de maintes reprises pour appeler les services de maintenance. Sans lui, je serais en prison pour dépassement de forfait téléphonique abusif...

Avant de poursuivre, je dois remercier deux personnes ayant eu un rôle clé dans ce projet. **Pierre-Mericam Bourdet** (DGA) pour avoir suivi ce projet durant 4 ans, et conseillé à plusieurs reprises. **Christian Spyckerelle** (EURENCO) pour la validation des protocoles, et ses nombreux conseils en terme de sécurité au laboratoire.

Merci à **Jérôme Silvestre** pour sa patience à toute épreuve, ses conseils avisés, son calme et ses idées de génie permettant de tout faire avec un morceau de mousse et deux trombones. Mac Gyver, c'est vous, avouez maintenant !!! Merci à **Marisol Goñi** du Laboratoire d'Ecologie Moléculaire de Pau pour m'avoir fait découvrir concrètement la biologie moléculaire et ses atouts, et m'avoir accueilli dans son laboratoire. Je tiens également à remercier **François Laurent** de l'UMR Xénobiotiques de l'INRA de Saint Martin du Touch pour notre collaboration sur les réacteurs.

Merci au professeur **Philippe Morard** pour m'avoir permis d'entrer à l'ENSAT en DEA, sans qui je ne connaîtrais même pas Toulouse.

Annick, qui oserait t'oublier ?? Toi qui a toujours été là pour moi, notre deuxième maman à tous, (que la première n'en soit pas offensée, j'ai dit à tous hein) dans tous les instants, les faciles les moins faciles, tu t'es toujours montrée disponible, ta gentillesse n'a d'égale que ta générosité, et cela te semble si naturel qu'on se demande pourquoi c'est pas pareil pour tout le monde... Je ne dois pas oublier, **Maritxu**, **Séverine**, **Jean**, pour leurs conseils avisés, merci à tous pour m'avoir soutenu, sans vous, ma thèse n'aurait pas été pareille.. Merci à tous les permanents qui m'ont également aidé durant ma thèse. Je ne dois pas oublier **Martine**, **Cathy**, **Laëtitia**, **Michèle** et **Sylvie** de l'INP avec qui j'ai passé beaucoup de bons moments lors des inscriptions. Merci pour votre bonne humeur et votre soutien. **Florence**, merci pour tes conseils et m'avoir guidée dans la dernière ligne droite, pour nos conversations scientifiques et philosophiques.

Thomas, tu n'hésites jamais à mettre ton intelligence et ta gentillesse au service des autres!! Merci pour ta maturité et ta modestie! **Aurore**, j'aurai contribué à te faire perdre du temps pour retrouver tes clés cachées sous une dalle du faux plafond ou dans une tirelire, désolé, j'espère que mon côté taquin n'aura pas eu raison de ta patience. **Tom** et **Aurore**, merci pour m'avoir fait découvrir le terrain surtout en plein hiver, merci pour la crève, et chapeau pour votre professionnalisme. Si un jour, vous avez besoin de quelqu'un quand le terrain est trop sec, n'hésitez pas à m'appeler... **Claire-Emmanuelle**, merci pour ces soirées crêpes, ces parties de badminton et de tennis, ces discussions sérieuses qui permettent d'avancer dans la vie, ces

moments de délire qui permettent d'avancer tout autant. **Bertrand**, il y a un son que j'aimerais pouvoir reproduire en l'écrivant mais je ne vois pas comment, je suis sûr que les gaulois du bureau 202 interprèteront pourtant justement ce « booo », je crois qu'on pourrait peut être publier là-dessus étant donné qu'on peut maintenant dialoguer qu'à partir de « boo » et de « pooiaa », à mon avis y a moyen de faire un papier, non ?...Merci pour ces soirées que nous avons passées ensemble, même si elles m'ont porté préjudice, je pense qu'elles porteront préjudice à d'autres...

Marie, merci de m'avoir supporté au sens propre comme au sens figuré durant ces 4 années. Pardon pour la clé dans l'azote liquide, pardon pour le portable, les copies d'écran, et toutes les petites surprises. Merci pour m'avoir permis de tenir la pression et m'avoir prêté l'oreille aussi souvent que nécessaire, je t'en suis et serai toujours reconnaissant.

Mea culpa pour tout que j'ai pu cacher et que vous pourriez retrouver caché sous un tiroir de bureau ou dans le plafond dans les mois qui viennent...

Boris merci pour m'avoir appris le fonctionnement du labo à mes débuts, pour ces parties de tennis enflammées, pour **LA**, merci à **Jane** aussi !! Merci aux doctorants, **Gaëlle** (et ses cours de mécanique pour deux roues...), **Laure**, **Anne-Sophie**, **Mohamadou**, **Matthieu**, **Damien**, et tous ceux que j'oublie pour leur soutien. Merci à **Matthieu Sangely** et **Stéphanie Thomas** stagiaires qui m'ont accompagné et sans l'aide de qui j'aurais eu du mal à mener ce projet à bien.

Merci à certaines personnes de l'ENSAT (enfin je me comprends et certains d'entre vous comprendront aussi, **S A** si tu nous regardes...), **Gérard** de l'accueil, **Christian** et **René** de l'atelier pour leur disponibilité, pour ces longues heures passées à vos côtés, à couper, poncer, boulonner, dégripper..., sans vous ma thèse n'aurait pas été une vraie thèse.

Une mention spéciale pour **Alain**, pour m'avoir fait découvrir que « on va faire un tour en VTT » pouvait ne pas être synonyme de petit tour tranquille en vélo, et qu'après 3h et 90km de sortie le matin, y a des gens qui sont capables de remonter sur le vélo l'après midi...

Dans la série des Warriors, **Thibaut**, mon compagnon d'armes, merci à toi l'ami pour m'avoir fait également découvrir qu'on pouvait faire un raid de 60km sans entraînement, certes on ne peut plus marcher pendant une semaine, mais le cerveau peut prendre le dessus sur les crampes. Merci pour toutes ces courses (d'orientation, à pied, à vélo, en canoé, en sac...) qui m'ont permis de relativiser la souffrance physique et la vie même. Merci pour ces matchs de tennis, ces championnats non sans pression où on avait l'impression que notre vie tenait à une balle. Merci à toi, **Fabi**, **Emma**, **Noan**, (tu diras aux petites que j'ai pris l'ordre alphabétique pour ne pas qu'il y ait de jalouses) pour votre gentillesse et votre générosité, pour m'avoir accueilli tant de fois en votre demeure. A tous ceux qui ne sont pas non plus du labo, mais m'ont connu en dehors, mon club, **Irène**, **Jean-Louis**, **Steph**, **Bruno**, **Marie**, le bureau, mention spéciale aux coachs **Aymeric** et **David**. Merci à l'association Planet Sciences (**Bérengère**, **Michael**, and coll) pour m'avoir fait découvrir une autre science, celle de faire découvrir, qui parfois peut se révéler plus enrichissant et plus gratifiant que la science elle-même. Merci à la **Banque postale** pour m'avoir fourni 53 RIB en 5 ans nécessaires aux remboursements (ou pas ou pas encore) de frais de mission. Merci à l'OM pour m'avoir remonté le moral à de nombreuses reprises, qui grâce à ses défaites (Allez Carquefou !) m'ont permis d'envoyer des messages de réconfort, (ou pas) qui bizarrement n'ont pas donné suite... Merci **Sophie** pour m'avoir soutenu dans la dernière ligne droite qui n'a pas été évidente, sans toi la fin de ma thèse n'aurait pas été la même. Enfin bien évidemment, merci à vous, mes parents qui malgré la distance avez su m'encourager, et toujours vous montrer présents, prêts à faire 700km au moindre petit problème d'humidité (juste quelques cm d'eau dans la chambre), malgré les km que vous engrangez chaque jour. Merci de m'avoir soutenu, et toujours encouragé, si j'en suis là c'est surtout grâce à vous.

Sommaire

INTRODUCTION	1
PARTIE I DONNEES BIBLIOGRAPHIQUES	5
Chapitre 1. Les composés nitrés	6
I. Explosifs.....	10
A. Origine et utilisation	10
B. Caractéristiques physico-chimiques	11
a) L'hexogène (hexahydro-1, 3, 5-trinitro-1,3,5-triazine).....	11
b) L'octogène (octahydro-1,3,5,7-tétranitro-1,3,5,7-tétrazocine)	12
c) Le TNT (2-4-6 trinitrotoluène)	13
C. Toxicité et écotoxicité des produits nitrés	13
a) Toxicité de l'hexogène	13
b) Toxicité de l'octogène	15
c) Toxicité du TNT	15
d) Toxicité des produits de métabolisation des explosifs	17
II. Pesticides.....	17
A. Domaines d'application.....	17
B. Mode d'action des Dinitrophénols	18
C. Caractéristiques physico-chimiques	19
a) Le Dinoseb.....	19
b) Le Dinoterb.....	20
D. Toxicité.....	20
Chapitre 2. Les procédés de dépollution	24
I. Les différentes méthodes de dépollution.....	27
A. Les procédés physico-chimiques	28
B. Les traitements thermiques.....	30
C. Les méthodes de confinement.	30
II. Les procédés biologiques	30
A. La phytodépollution.....	31
B. La bioremédiation.....	31
a) Les traitements « <i>in situ</i> ».	32
b) Les traitements hors site	33
III. Bioremédiation des produits nitrés.....	35
A. Les nitramines	35

a)	Biodégradation aérobie du hexogène et du octogène.....	36
b)	Biodégradation en conditions anoxique ou anaérobie de l'hexogène et de l'octogène.....	37
B.	Les composés nitro-aromatiques	40

PARTIE II ETUDE EXPERIMENTALE 42

Chapitre 1. Caractéristiques physico-chimiques du sédiment 43

I.	Dispositif de prélèvement.....	45
II.	Description macroscopique des sédiments	47
A.	Au sommet de tous les sédiments.....	47
B.	Prélèvement zone 3.....	48
C.	Prélèvement zone 4.....	48
D.	Prélèvement zone 7.....	48
E.	Prélèvement zone 9.....	48
III.	Descriptif des analyses physico-chimiques	49
A.	Analyse de la matière sèche.....	49
B.	Mesure du pH	49
C.	Analyse des éléments alcalins et alcalino terreux hydrosolubles	50
D.	Dosage des carbonates (CO_3^{2-})	51
E.	Dosage du carbone organique total (COT).....	52
F.	Dosage de l'azote total : Méthode Kjeldahl.....	53
G.	Microanalyse : dosage du carbone, azote, soufre, et hydrogène.....	53
H.	Dosage de l'oxygène (O_2).....	53
IV.	Résultats	54
A.	Analyse de la matière sèche.....	54
B.	Mesure du pH	54
C.	Analyse des éléments alcalins et alcalino terreux hydrosolubles	56
D.	Dosage des carbonates.....	57
E.	Dosage du COT	58
F.	Dosage de l'azote total : Méthode Kjeldahl et CHONS	61
G.	Dosage du soufre, oxygène et hydrogène	64

Chapitre 2. Mise au point d'un protocole de dosage des composés organiques. 67

I.	Expériences d'extraction et dosage sur matrice solide	69
A.	Principe de l'extraction par ASE	69
B.	Mise au point du protocole	70
a)	Extraction.....	70
b)	Analyse chromatographique	71
II.	Expériences d'extraction et dosage sur matrice liquide	73

Chapitre 3. Caractéristiques microbiologiques du sédiment	87
I. Dispositif expérimental destiné à l'identification des microorganismes	89
A. Extraction et dosage de l'ADN.....	89
B. Analyse t-RFLP.....	90
C. Séquençage génétique	90
a) Amplification.....	90
b) Purification	92
c) Clonage.....	92
d) Amplification de l'insert.....	92
e) Digestion Enzymatique.....	93
f) Séquençage	94
II. Résultats de l'étude d'identification des microorganismes.	95
A. Extraction de l'ADN.....	95
B. Analyse t-RFLP.....	96
C. Séquençage génétique	97
a) Amplification :	97
b) Purification	98
c) Clonage.....	98
d) Amplification de l'insert.....	99
e) Digestion enzymatique	100
f) Séquençage	100
 Chapitre 4. Essais de bioremédiation par fermentations en milieu liquide.	 105
I. Essais de dégradation des composés présents dans le sédiment endogène.....	107
A. Mise en place de l'essai	107
a) Description et fonctionnement.....	107
b) Plan d'expérience.....	108
c) Paramètres suivis	108
B. Résultats	109
a) Variation du pH	109
b) Variation des concentrations en contaminants.....	109
c) Bilan des populations microbiennes	112
II. Essais de dégradation du Dinoterb sur souches pures	116
A. Mise en place de l'essai	117
a) Description et fonctionnement.....	117
b) Plan d'expérience.....	117
c) Paramètres suivis	118
B. Résultats	118
a) Dynamique des populations.....	118
b) Dégradation du Dinoterb en fonction des souches.....	119

Chapitre 5. Réacteurs mixtes en conditions aéro-anaérobie.	122
A. Descriptif et fonctionnement du système	124
B. Plan d'expérience	125
C. Paramètres étudiés	126
a) Suivi du pH	126
b) Cinétique de disparition des herbicides et des explosifs	126
c) Suivi des anions	126
d) Suivi des populations grâce au FISH (Fluorescent in situ hybridization)	126
e) Suivi d'un réacteur par traçage radioactif	128
I. Résultats	130
A. Suivi préalable du pH	130
B. Cinétique de disparition des explosifs et herbicides	131
a) Disparition d'un composé X	132
b) Apparition d'un composé Y	133
C. Suivi des anions	135
D. Dynamiques des populations dans le fermenteur	136
E. Suivi des métabolites par traçage radioactif	141
a) Surcharge du réacteur par du [¹⁴ C]- hexogène	141
b) Surcharge d'un réacteur à t=0 par du [¹⁴ C]-hexogène et du [¹⁴ C]-TNT	144
CONCLUSION	148
PARTIE III BIBLIOGRAPHIE	156
PARTIE IV ANNEXES	166
Annexe I : Caractéristiques physico-chimiques des produits étudiés	167
Annexe II : Calcul de la part du carbone issu des effluents industriels	168
Annexe III : Profils RFLP	169
Annexe IV : Séquences	172
Annexe V : Communication écrite	177
Annexe VI : Ajustement du pH des prélèvements avant extraction et dosage	180
Annexe VII : Article	181
Annexe VIII : Protocole du FISH	200

Liste des figures

Figure 1 : Structure chimique de l'hexogène (RDX).....	11
Figure 2 : Structure chimique de l'hexamine	12
Figure 3 : Structure chimique de l'octogène (HMX).....	12
Figure 4 : Structure chimique du TNT (2-4-6 trinitrotoluène)	13
Figure 5 : Synthèse de TNT par nitration du toluène	13
Figure 6 : Structure chimique du Dinoseb.....	19
Figure 7 : Structure du Dinoterb.....	20
Figure 8 : Evolution des sites pollués répertoriés en France entre 1978 et 2007.	26
Figure 9 : Relation entre le potentiel redox et la composition de couples redox importants dans les sols (Rowell, 1981).....	38
Figure 10 : Equation montrant l'implication des donneurs d'électrons durant la dégradation des explosifs en anaérobie.....	39
Figure 11 : Photographie de la lagune étudiée.....	44
Figure 12 : Maillage de la lagune (chaque zone possède une surface d'environ 500 m²). 45	
Figure 13 : Subdivisions en couches visuellement homogènes de chaque point de prélèvement.	46
Figure 14 : Carottage des sédiments de la lagune.....	47
Figure 15 : Principe de l'extraction des composés hydrosolubles sur cartouche	50
Figure 16 : Chromatographe ionique Dionex DX 100.	51
Figure 17: Montage d'un calcimètre de Bernard permettant le dosage des carbonates. ...	52
Figure 18 : Pourcentage de matière sèche des échantillons prélevés dans la lagune.	54
Figure 19 : pH à l'eau mesuré dans les échantillons prélevés dans la lagune.	55
Figure 20 : pH au KCl mesuré dans les échantillons prélevés dans la lagune.....	55
Figure 21 : Pourcentage de carbonates sous forme CaCO ₃ présents dans le sédiment.	58
Figure 22 : Pourcentages de COT observés dans les échantillons de la lagune (n=3)	59
Figure 23 : Comparaison du carbone des carbonates avec le carbone total.	60
Figure 24 : Pourcentage d'azote mesuré dans les échantillons de la lagune.	62
Figure 25 : Azote pouvant être attribué à la fraction apportée par NO ₂	62
Figure 26 : Rapport N Kjeldahl / N total	63
Figure 27 : Rapport C/N des échantillons prélevés dans la lagune.	63
Figure 28 : Rapport soufre/azote des échantillons prélevés dans la lagune.	64

Figure 29 : Rapport (3S+2N)/O des échantillons prélevés dans la lagune	65
Figure 30 : Extracteur à Solvants Accélérés (Dionex).	70
Figure 31 : Courbe d'étalonnage obtenue pour l'octogène et l'hexogène pour effectuer la quantification par détection en masse.	71
Figure 32 : Chromatogrammes obtenus avec les masses des ions spécifiques trouvés dans l'échantillon de la zone 4.1 après extraction par un mélange Acétone/Hexane.....	72
Figure 33 : Maillage de la lagune	88
Figure 34 : Gel d'électrophorèse montrant la qualité des ADN extraits à partir des sédiments et des enrichissements (SL = Smart Ladder).....	89
Figure 35 : Représentation schématique d'une amplification par PCR. Dénaturation puis hybridation et enfin extension.	91
Figure 36 : Principe de la digestion par les enzymes de restriction.	94
Figure 37 : Gel présentant l'ADN extrait dans le sédiment ainsi que dans les enrichissements (SL = Smart Ladder).....	96
Figure 38 : Profil RFLP du brin d'ADN 5' des échantillons prélevés dans la lagune préalablement digérés par l'enzyme Hae III.	96
Figure 39 : Profil RFLP du brin d'ADN 5' des échantillons prélevés dans la lagune préalablement digérés par l'enzyme Hinp.....	97
Figure 40 : Gel présentant l'amplification des échantillons destinés au séquençage.....	98
Figure 41 : Gel de contrôle après purification des produits de PCR non marqués.....	98
Figure 42 : Résultats du clonage effectué sur Z4.	99
Figure 43 : Gels de contrôle après clonage effectué sur Z4.	99
Figure 44 : Comparaison des séquences des bactéries présentes dans le sédiment avec la banque de données Genbank à l'aide du moteur BLAST.	102
Figure 45 : Arbre phylogénétique des populations microbiennes présentes dans les échantillons Z4.....	103
Figure 46 : Suivi du pH dans les fermentations en milieu liquide.....	109
Figure 47 : Evolution de la concentration en herbicides sur 75 jours dans la fraction liquide des fermenteurs en présence (AA4) et en absence (AA1) de glucose après quantification par détecteur de masse.	110
Figure 48 : Evolution de la concentration en explosifs sur 75 jours dans la fraction liquide des fermenteurs en présence (AA4) et en absence (AA1) de glucose après quantification par détecteur de masse.....	111

Figure 49 : Comparaison des séquences des bactéries présentes dans l'enrichissement AA4 avec la banque de données Genbank à l'aide du moteur BLAST.	113
Figure 50 : Arbre phylogénétique des populations microbiennes présentes dans l'échantillon AA4.....	114
Figure 51 : Cinétique de croissance bactérienne par suivi de la DO600	119
Figure 52 : Tests de biodégradation en présence (A) et en absence (B) de glucose. L'étude de la dégradation du Dinoterb a été réalisée entre 0 () et 5 () jours de culture. Les marques * et ** représentent des valeurs significatives $p < 0,01$ et $p < 0,05$ respectivement au test de Tukey.....	120
Figure 53 : Rapport DO/DNTB au temps 5 jours.....	121
Figure 54 : Procédés non agricoles destinés à la production de biogaz (d'après Moletta, 2005). A : arrivée d'effluent à traiter ; S : sortie de l'effluent traité ; G : récupération du biogaz ; R : recyclage.....	123
Figure 55 : Schéma du dispositif pilote	125
Figure 56 : Lame de microscopie pour hybridation in situ par fluorescence à 8 puits....	128
Figure 57 : Evolution du pH des réacteurs au cours du temps.	130
Figure 58 : Cinétique de dégradation des explosifs dans les réacteurs. (Ecart-type , n=3)	131
Figure 59 : Cinétique de dégradation des herbicides Dinoterb (DNTB) et Dinoseb (DNSB) dans les réacteurs. (Ecart-type, n=3).....	132
Figure 60 : Cinétique d'apparition de métabolites potentiels issus de l'essai en réacteur.	132
Figure 61 : Cinétique d'apparition d'un composé à $m/z=206$	133
Figure 62 : Métabolites observés dans les réacteurs entre 57 et 105 jours de fonctionnement.....	135
Figure 63 : Suivi des anions durant le fonctionnement d'un réacteur.	136
Figure 64 : FISH obtenu avec une sonde dirigée sur l'ARNr 16s de <i>Pseudomonas</i>	137
Figure 65 : Nombre total de positifs observés au cours du fonctionnement d'un réacteur	138
Figure 66 : Abondance relative totale en familles de microorganismes dans le réacteur	138
Figure 67 : Abondance en microorganismes dans le réacteur (en nombre de positifs)...	140
Figure 68 : Radio-chromatogramme de l'effluent du réacteur 1 après 96 h de fonctionnement avec une charge en [^{14}C] hexogène (15 μCi , 5 mg).	142

Figure 69 : Spectre de masse de métabolite retrouvé après 96 h d'incubation du premier réacteur	143
Figure 70 : Radio-chromatogramme de l'effluent du réacteur 2 après 3 jours de fonctionnement avec une charge en [^{14}C]-hexogène (15 μCi , 5 mg) et en [^{14}C] TNT (30 μCi , 5 mg).	145
Figure 71 : Radio-chromatogramme de l'effluent du réacteur 2 après 8 semaines de fonctionnement avec une charge en [^{14}C]-hexogène (15 μCi , 5 mg) et en [^{14}C]-TNT (30 μCi , 5 mg).	146
Figure 72 : Modification de la solubilité du DNTB en fonction du pH	180

Liste des tableaux

Tableau 1 : Familles d'explosifs et leurs principaux représentants.....	7
Tableau 2 : Principales familles chimiques de pesticides en fonction de leur activité herbicides, insecticides ou fongicides (ACTA, 2005).....	8
Tableau 3 : Données toxicologiques pour l'hexogène, l'octogène et le TNT (données non exhaustives).....	16
Tableau 4 : Données toxicologiques pour le Dinoseb et le Dinoterb	23
Tableau 5 : Concentrations d'explosifs retrouvées dans des sols d'usine.....	27
Tableau 6 : Etudes de biodégradation disponibles dans la littérature (liste non exhaustive).....	36
Tableau 7 : Influence de donneurs d'électrons sur la dépollution d'explosifs	40
Tableau 8 : Concentrations en octogène, hexogène, TNT, Dinoseb, et Dinoterb en surface de chaque zone (0-40cm).	45
Tableau 9 : Pourcentage de cations présents dans les échantillons prélevés dans la lagune.	56
Tableau 10 : Pourcentage d'anions présents dans les échantillons prélevés dans la lagune.	57
Tableau 11 : Pourcentage de carbone dû aux carbonates et carbone organique total corrigé.....	58
Tableau 12 : Comparaison des données d'analyse avec le pourcentage de carbone mesuré dans les échantillons.....	61
Tableau 13 : Analyse H, O et S des échantillons prélevés dans la lagune.	64
Tableau 14 : Séquences nucléotidiques des amorces.	90
Tableau 15 : Composition du mix PCR pour l'amplification de l'insert.....	93
Tableau 16 : Description des étapes de la PCR	93
Tableau 17 : Composition du mix PCR pour le séquençage	95
Tableau 18 : Cycles thermiques pour PCR du séquençage	95
Tableau 19 : Profils obtenus pour les clones issus de la couche Z4 1.	100
Tableau 20 : Composition du milieu de Winogradsky	107
Tableau 21 : Sondes FISH appliquées aux familles et à certaines espèces de bactéries.	128
Tableau 22 : Composition de la solution tampon d'hybridation	200
Tableau 23 : Composition de la solution tampon de nettoyage.....	201

Liste des abbréviations

AFNOR : Association Française de Normalisation.

CE50 : « Concentration d'effet à 50% » ou concentration pour laquelle un effet a été observé sur 50% de la population testée.

CL₅₀ : "Lethal Concentration 50%" ou concentration ayant causé la mort de 50% de la population testée (exprimée en mg de toxique par litre d'eau ou d'air).

DL₅₀ : "Lethal Dose 50%" ou dose ayant causé la mort de 50% de la population testée. (Exprimé en mg de toxique par kg de masse corporelle).

DNOC : Dinitro ortho crésol.

DRIRE : Directions Régionales de l'Industrie de la Recherche et de l'Environnement.

EPA : Environmental Protection Agency (USA).

HMX : **H**igh **M**elting **eX**plosive, **H**er **M**ajesty **eX**plosive, **H**igh velocity **M**ilitary **eX**plosive, **H**igh **M**olecular weight **rdX**, Octogène.

HPLC-DAD ou HPLC UV : "High Pressure Liquid Chromatography Diode Array" ou Chromatographie en Phase Liquide à Haute Pression Ultra Violet.

Kow : Coefficient de répartition octanol/eau. En dessus d'une valeur de 3 (échelle logarithmique), il y a risque de bioaccumulation.

OCDE : Organisation de coopération et de développement économiques

PCR : Polymerisation Chain Reaction.

RDX : cyclotriméthylène trinitramine, cyclonite, hexogène.

RFLP : Restriction Fragment Length Polymorphism.

TNT : 2,4,6-trinitrotoluène.

Introduction

L'intérêt pour les explosifs remonte à de nombreux siècles, ils furent inventés par les chinois au premier siècle avant JC. Ces derniers utilisaient de la poudre noire pour créer des feux d'artifices. En Europe, les anglais et les allemands les ont utilisés à des fins militaires pour les canons dès le XIV^{ème} siècle. La poudre noire répond à la formule moyenâgeuse alchimique traditionnelle « Six, As, As » soit, 75 % de salpêtre, 12,5 % de soufre et 12,5% de charbon de bois. Au XIX^{ème} siècle, cette poudre fut utilisée sous forme de granulés, car la combustion était plus progressive et moins brutale. Le développement de la chimie au cours du XIX^{ème} siècle a conduit à l'apparition de nouveaux explosifs. Nous pouvons citer la nitration de la cellulose par Braconnot (1833) et Schönbein (1846) pour former la nitrocellulose ou encore la nitration de la glycérine par Soberot (1847) pour former la nitroglycérine. C'est le suédois Alfred Nobel qui en réussissant à faire absorber la nitrocellulose par de la nitroglycérine ouvre vers 1870, l'ère des applications des explosifs dans l'industrie. En 1884, le belge Favier suggère l'emploi d'explosifs au nitrate d'ammonium, dont la température d'explosion est peu élevée. Les explosifs modernes sont nés juste avant la première guerre mondiale. En effet, le Trinitrotoluène (TNT ou tolite) a été fabriqué industriellement en Allemagne à partir de 1891 et utilisé comme chargement standard des obus en 1902. Le TNT reste aujourd'hui encore l'explosif de référence. A la même époque, en France, le Trinitrocrésol (ou acide picrique) est introduit par Turpin comme l'homologue du TNT, en revanche, la matière première est plus facile d'accès puisqu'elle est issue de la distillation de la houille. Entre les deux guerres mondiales, la famille des nitramines apparût avec notamment l'hexogène (RDX) puis plus récemment l'octogène (HMX), par nitration de l'hexaméthylène-tétramine.

Par ailleurs, la lutte chimique a pris naissance au XIX^{ème} siècle, par l'emploi du soufre (1843), de la bouillie bordelaise (1885) pour la protection du vignoble, de dérivés arsenicaux contre le doryphore (1872). L'apparition des dinitrophénols vers 1932 puis la découverte du DDT par Muller (1940) marque le début de l'ère des pesticides. Presque simultanément apparurent le parathion, et le 2,4 D rendant possible le désherbage sélectif. Depuis, des milliers de substances ont été synthétisées et étudiées.

Ainsi des molécules nitrées voisines des explosifs ont des propriétés herbicides, aussi les industries chimiques ont souvent produit sur le même site, à la fois des explosifs et des herbicides. Les effluents industriels issus d'anciennes unités de production de ces molécules ont généralement été déversés dans des lagunes utilisées comme bacs de décantation. Aujourd'hui, les sédiments issus de ces lagunes représentent une source de pollution qui atteint les sols, les eaux surfaciques et les nappes phréatiques (Myler et Sisk, 1991).

De plus, tous ces composés nitrés présentent pour la plupart une toxicité aiguë pour l'environnement. L'hexogène et ses métabolites sont connus pour être toxiques pour les organismes aquatiques et terrestres (Zhang *et al.*, 2006; Mukhi *et al.*, 2005; Robidoux *et al.*, 2004). La Commission Européenne a retiré le Dinoterb de la vente en Avril 1998 (Décision 98/269/CE) et l'Agence pour la protection de l'Environnement des Etats Unis d'Amérique classe les nitrophénols comme polluants prioritaires (HR-3 grade). Le Dinoseb est quant à lui répertorié pour avoir des propriétés tératogènes et son utilisation comme phytosanitaire a été interdite par la commission Européenne en 1995.

Si la qualité de l'environnement a longtemps été négligée, la loi oblige aujourd'hui à répertorier les sites et sols pollués et à limiter leur impact sur les milieux naturels. Pour cela, des systèmes de traitement de ce type de déchets existent. Les techniques conventionnelles de dépollution des sites industriels font principalement appel à des procédés thermiques. Ils sont très onéreux car ils nécessitent l'excavation des sols, le transport, et l'incinération. De plus, ces procédés génèrent des déchets à enfouir en décharge classées et occasionnent un très fort impact environnemental. Il est donc nécessaire d'envisager d'autres méthodes de dépollution faisant appel à des procédés biologiques, moins onéreux et plus écologiques. Par contre, ils nécessitent des processus différents, qui dépendent des paramètres inhérents au site à dépolluer : nature et composition du sol, pH, hygrométrie, température de la zone, diversité biologique.

Objectifs

L'objectif de ce travail a consisté à mettre en place une démarche qui permette d'une part, d'évaluer les caractéristiques physico-chimiques et microbiologiques d'une zone fortement contaminée par des produits pyrotechniques et autres composés organiques et d'autre part, de diminuer son niveau de pollution en utilisant des méthodes biologiques. La stratégie utilisée a consisté à rechercher les conditions physico-chimiques permettant le développement de la flore endogène et à stimuler leur capacité à dégrader les principaux contaminants. Ce travail de thèse s'inscrit dans un Plan d'Etude Amont (PEA) financé par la DGA en partenariat avec une industrie spécialisée dans la nitration de molécules chimiques et l'INRA de St Martin du Touch (UMR Xénobiotiques).

Cette étude a été réalisée en plusieurs étapes :

- Etude descriptive de la zone. Cette étude consiste en un état des lieux du site, incluant l'analyse des polluants, la nature et la composition des sédiments, ainsi que l'étude de la microflore des sédiments.
- Etude de bioremédiation :
 - o Une approche de fermentations en milieu liquide en condition anaérobie
 - o Une approche en bioréacteur mixte en conditions aéro-anaérobie.

La première partie de ce travail vise, grâce à une étude bibliographique, à présenter les principales caractéristiques des produits chimiques abordés au cours de cette étude. Nous concentrerons alors la recherche bibliographique sur les différents procédés de dépollution aboutissant à la biodépollution des produits organiques persistants. Dans un second temps nous présenterons les principaux résultats de nos travaux.

PARTIE I

Données bibliographiques

Chapitre 1.

Les composés nitrés

Depuis le développement de la chimie organique dans les années 1830, les chimistes ont synthétisé de nombreux composés par nitration. Les usines maîtrisant la nitration de composés cycliques produisent une large gamme de composés chimiques. Parmi les molécules nitrées, certaines sont dédiées à l'usage pyrotechnique (hexogène, octogène, TNT, acide picrique), ou encore ont des propriétés de pesticides (Dinoterb, Dinoseb, DNOC, ...), d'autres sont produites et destinées à un usage pharmaceutique.

Les molécules d'explosifs sont regroupées en quatre grandes familles (Tableau 1) suivant les fonctions chimiques présentes :

Tableau 1 : Familles d'explosifs et leurs principaux représentants.

(Tachon *et al.*, 2007)

Familles	Nitroaromatiques (NAC)	Nitramines	Esters nitriques	Peroxydes Organiques
Composés	-1,3,5- Trinitrotoluène (TNT) -Acide Picrique -Hexanitrostilbène (HNS)	-Octogène (HMX) -Hexogène (RDX).	-Pentrite (PETN) -Ethylène glycol dinitrate (EGDN) -Nitroguanidine (NGA)	-Triacétone triperoxyde (TATP) -Hexaméthyl triperoxyde (HMTD)

Les données concernant la production d'explosifs en terme de tonnage relèvent pour la plupart des pays de la confidentialité. Les niveaux de production de TNT les plus élevés ont été produits à la fin de la Seconde Guerre Mondiale, la production mondiale était alors estimée à 150 ktonnes par mois (Comfort, 2006).

Concernant les pesticides, avec plus de 76000 tonnes vendues en 2004, la France est aujourd'hui le 3^{ème} consommateur mondial après les Etats Unis et le Japon. Le monde agricole est de loin le premier utilisateur puisque 90% des pesticides sont destinés à ce secteur. Les pesticides entrent également dans la composition de nombreux produits d'usage courant destinés notamment à l'éradication des insectes dans les habitations, à l'élimination des parasites des animaux domestiques ou encore à la protection du bois.

Les pesticides appartiennent à plusieurs familles décrites dans le Tableau 2.

Tableau 2 : Principales familles chimiques de pesticides en fonction de leur activité herbicides, insecticides ou fongicides (ACTA, 2005)

Herbicides	Insecticides	Fongicides
-amides -amino phosphonates -ammonium quaternaires -aryloxyphenoxypropionates -benzimidés -benzonitriles -carbammates -cyclohexane diones -dérivés de l'acide benzoïque -dérivés de l'oxadiazole -dérivés de l'urée -dérivés du benzofuranne -dérivés phtaliques -dérivés picoliniques -diazines et triazines -diphényl éther -imidazolinones -oximes -phénols nitrés -phythormones -sulfonylurées -toluidines -triazinones -triazoles	-organophosphorés -organochlorés -carbammates -pyréthrinoides de synthèse -carbinols -sulfones et sulfonates -amidinohydrazones -carbamyl triazoles -chloronicotiniles -formamidines -norpyréthrates -phénylpyrazoles -thiadiazines -produits d'origine biologique	-carbammates -dérivés du benzène -dérivés du phénol -phénylurées -quinones -dicarboximides -amines, amides -diazines -sulfamides et dérivés soufrés -triazoles -fongicides divers -produits d'origine minérale -soufre et cuivre

Parmi tous ces composés chimiques synthétisés d'une manière générale, certains peuvent se révéler toxiques pour les espèces indigènes des sites contaminés. Cette toxicité explique la nécessité d'une dépollution des sites et d'une limitation de la dispersion de ces composés. La toxicité de ces composés a été très étudiée durant ces dernières années en utilisant des organismes aquatiques, des espèces terrestres telles que les vers de terre, des mammifères ou

encore des monocytes humains. La diversité des valeurs de toxicité montre la diversité de sensibilité des différents organismes testés.

Les effets toxiques peuvent se manifester à tous les niveaux d'organisation de l'individu exposé aux contaminants : niveau métabolique (activités enzymatiques, notamment celles impliquées dans les processus de détoxification, protéines de stress), niveau physiologique (croissance linéaire et pondérale, bioaccumulation, reproduction, ontogenèse, germination chez les organismes végétaux, motricité, survie/mortalité), ainsi qu'au niveau cellulaire (ADEME, 2004).

D'une manière générale, le risque toxicologique peut être évalué si les conditions suivantes sont réunies :

- Existence d'une source de pollution
- Existence d'une voie de transfert vers une cible
- Présence d'une cible

Le risque sanitaire peut se définir comme une fonction des conditions citées précédemment et s'écrire comme suit :

Risque sanitaire = f (source de pollution, transfert des polluants, cible (santé publique))
(Karg, 2001)

L'exposition à des produits toxiques peut entraîner chez l'Homme différents types d'effets :

- Intoxication aiguë : liée à une pénétration massive du produit dans l'organisme, les symptômes digestifs, cardio-vasculaires, respiratoires, nerveux, etc, apparaissent peu de temps après le contact (24 à 48h). Cette toxicité est généralement assez bien connue. Elle est évaluée par la DL50¹ ou la CL 50².
- Intoxication chronique : résultat d'une exposition répétée ou continue à des doses faibles. Les signes apparaissent souvent très tardivement et ont des conséquences multiples :

✓ Cancérigène-mutagène

¹ DL50 : dose ayant causé la mort de 50% de la population testée. (Exprimé en mg de toxique par kg de masse corporelle).

² CL 50 : concentration ayant causé la mort de 50% de la population testée (exprimée en mg de toxique par litre d'eau ou d'air).

- ✓ Tératogène
- ✓ Stérilité
- ✓ Atteinte progressive d'un organe (foie, rein,...)

Le site que nous étudions est une lagune³ contaminée par des produits nitrés de type explosifs et herbicides et d'autres produits secondaires issus de procédés chimiques industriels. Les deux explosifs principaux appartiennent à la famille des nitramines, à savoir le RDX (hexogène ou hexahydro-1,3,5-trinitro-1,3,5-triamine) et le HMX (octogène ou octahydro-1,3,5,7-tétranitro-1,3,5,7-tétrazocine). Les deux herbicides étudiés dans ce travail sont des dinitrophénols : le Dinoseb (2-sec-Butyl-4,6-Dinitrophenol) et le Dinoterb (2-ter-butyl-4,6 dinitrophenol).

Avant d'envisager leur dégradation, il est nécessaire de mieux connaître tous ces composés. Ainsi, après avoir décrit leur utilisation et leurs caractéristiques physico-chimiques, nous nous intéresserons aux risques toxicologiques et écotoxicologiques que ces produits peuvent présenter.

I. Explosifs

A. Origine et utilisation

L'hexogène, l'octogène (nitramines) et le TNT (nitroaromatiques) sont classés comme des explosifs très répandus depuis le début du XX^{ème} siècle, ce sont des composants principaux de la majorité des munitions utilisées par les forces militaires dans le monde.

L'hexogène est un composé chimique très stable, considéré comme l'un des explosifs militaires les plus puissants. L'hexogène peut entrer dans la composition d'explosifs composites, à savoir, la composition B (mélange TNT/hexogène), le Torpex (mélange TNT/hexogène/Al), les cyclotols, DBX, HBX, ainsi que les explosifs plastiques tels que le C4 et le Semtex (Agrawal et Hodgson, 2007).

Actuellement, l'octogène est l'explosif le plus puissant utilisé dans le monde. En revanche, bien que l'octogène soit plus puissant que l'hexogène, son coût de production est plus élevé. L'octogène est principalement utilisé comme explosif militaire dans les missiles ou les bombes. Il connaît une application importante de nos jours dans l'industrie pétrolière

³ Lagune : étendue d'eau peu profonde qui dans le cas présent a permis la sédimentation de produits solides.

(charge creuse, forages). Il est fréquemment utilisé comme détonateur pour permettre l'explosion d'un explosif principal moins cher mais plus difficile à allumer. On s'en sert également pour confectionner des cordons de détonation performants. L'octogène peut être associé à du TNT pour donner l'Octol (75% de HMX pour 25% de TNT) ou encore l'octal (70% octogène et 30% de poudre d'aluminium) fréquemment placés dans les charges explosives. L'octogène est également utilisé dans les explosifs de type plastiques (Agrawal et Hodgson, 2007).

Le TNT a été l'explosif le plus largement utilisé dans les munitions depuis plus d'un siècle. Il est actuellement largement utilisé dans différentes compositions d'explosifs (voir paragraphes précédents).

B. Caractéristiques physico-chimiques

Pour chaque molécule, les caractéristiques spécifiques (CAS, Poids moléculaire, point de fusion, ...) sont détaillées en annexe I.

a) L'hexogène (hexahydro-1, 3, 5-trinitro-1,3,5-triazine)

L'hexogène (Figure 1) est un solide qui a souvent été synthétisé de façon conjointe à l'octogène.

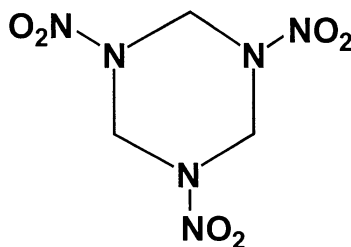


Figure 1 : Structure chimique de l'hexogène (RDX)

Classiquement, l'hexogène est synthétisé par nitrolyse de l'hexamine $(\text{CH}_2)_6\text{N}_4$. Cette synthèse peut se faire selon différentes méthodes :

La synthèse la plus connue se fait selon le procédé de Bachmann. Ce procédé est utilisé aux Etats Unis et passe par l'utilisation d'un milieu acéto-nitrique réagissant avec l'hexamine. (Cf Figure 2)

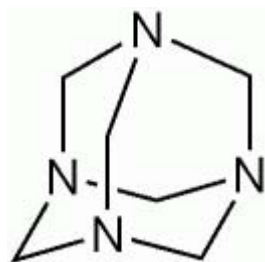
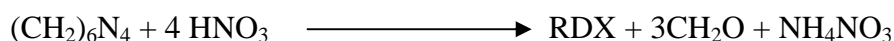


Figure 2 : Structure chimique de l'hexamine

La synthèse de l'hexogène sur le site d'étude se réalise selon le procédé de Woolwich. Ce procédé passe par un traitement de l'hexamine par de l'acide nitrique. Une équation extrêmement simplifiée ne tenant pas compte des intermédiaires réactionnels pourrait s'écrire :



Le temps de demi-vie de l'hexogène dans un sol humide est compris entre 94 et 154 jours (Jenkins *et al.*, 2003).

b) L'octogène (octahydro-1,3,5,7-tétranitro-1,3,5,7-tétrazocine)

L'octogène (Figure 3) est un polynitramine possédant un point de fusion plus élevé que l'hexogène (286 °C au lieu de 205°C pour l'hexogène, voir annexe I) d'où son nom de High Melting eXplosive. L'octogène a été isolé pour la première fois accidentellement en 1940 par Bachmann (Bachmann et Sheehan, 1949). En effet, l'octogène a été découvert comme sous produit de la réaction de synthèse de l'hexogène, celle ci conduisant à la formation de 8 à 12 % d'octogène.

Ainsi tout comme l'hexogène, l'octogène peut également être fabriqué à partir de la nitrolyse de l'hexamine.

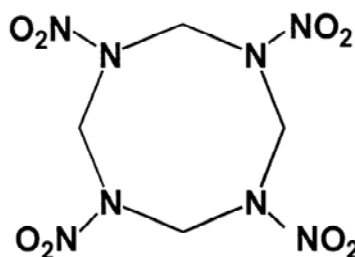


Figure 3 : Structure chimique de l'octogène (HMX)

Le temps de demi-vie de l'octogène dans le sol est compris entre 133 et 2310 jours (Jenkins *et al.*, 2003).

c) Le TNT (2-4-6 trinitrotoluène)

Le TNT fait partie du groupe des nitroaromatiques caractérisés par un cycle aromatique sur lequel sont greffés trois groupements nitrés. Dans l'eau et en présence de lumière, le TNT se décompose, le temps de demi-vie va de 0,5 à 22 h (Spanggord *et al.*, 1982).

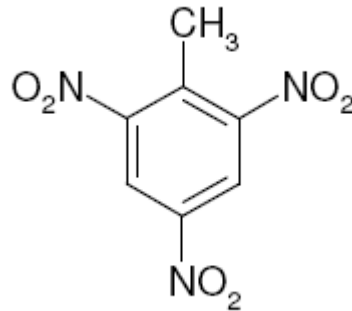


Figure 4 : Structure chimique du TNT (2-4-6 trinitrotoluène)

Le TNT est obtenu par nitration du toluène, une contamination par le TNT est donc souvent accompagnée d'impuretés de type dinitrotoluène (2,4-DNT, 2,6-DNT et 3,4-DNT) et de nitrotoluène (2-NT, 3-NT et 4-NT).

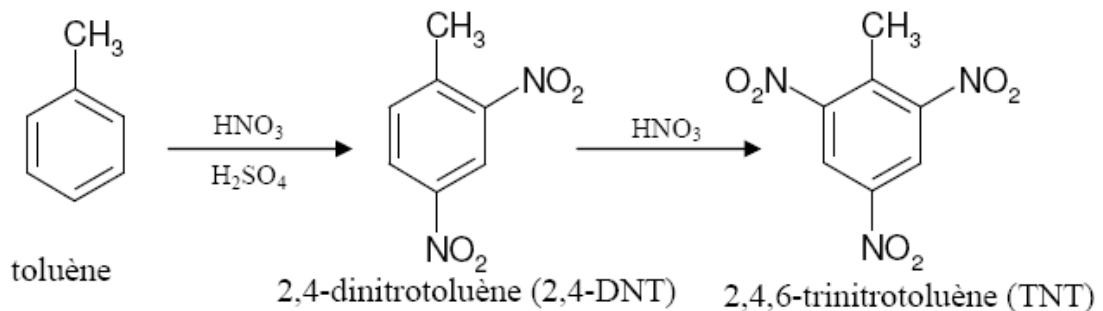


Figure 5 : Synthèse de TNT par nitration du toluène
(Humphrey et Smoak, 1960)

C. Toxicité et écotoxicité des produits nitrés

a) Toxicité de l'hexogène

Les effets de l'hexogène et/ou de ses métabolites ont été étudiés chez différents organismes. Robidoux *et al* (2002) ont démontré que l'hexogène avait un effet significatif sur

la reproduction des vers de terre *Eisenia andrei* à partir de 95 mg/kg de sol. Des études chez le poisson zèbre *Danio rerio* révèlent que la concentration nécessaire pour causer la mort de 50% des individus (CL50) à 96 h était de 22,9 mg/L et la concentration qui produit 50% de l'effet maximal observé (CE50) pour la déformation de la colonne vertébrale était de 20,8 mg/L à 96 h d'exposition (Mukhi *et al.*, 2005). Des salamandres entièrement terrestres (*Plethodon cinereus*) ont été exposées à des concentrations de 0, 10, 100, 1000 et 5000 mg l'hexogène par kg de sol durant 28 jours (Johnson *et al.*, 2004). A la plus forte concentration, des effets neuromusculaires (tremblements, hypersensibilité, léthargie) et une perte de poids étaient observés.

Les effets d'une exposition à l'hexogène chez les oiseaux ont été déterminés chez la caille des blés (*Colinus virginianus*) (Gogal *et al.*, 2003). Cette espèce sauvage est potentiellement présente sur les sites contaminés. Les doses orales ayant un effet ont été déterminées après 14 jours et 90 jours à 187 mg/kg pour les femelles et 280 mg/kg pour les mâles. Les régimes contenant des doses supérieures ou égales d'hexogène ont provoqué une diminution de la consommation alimentaire, du poids et de la production d'oeufs avec une réponse dose-dépendante.

De même, des mammifères exposés à l'hexogène présentent des désordres du système nerveux central. Pour l'homme, une dose chronique par voie orale de 0,003mg/kg/jour a été calculée en extrapolant les résultats d'une étude de 2 ans sur les rats (USEPA, 1993). Le principal effet observé fut une inflammation de la prostate. L'exposition d'ouvriers à l'hexogène par inhalation ou par une prise orale est caractérisée par des convulsions, des maux de tête, des nausées, des vomissements et des pertes de connaissance. Ces effets disparaissent après l'exposition (Vila, 2006). Selon les expérimentations, l'effet carcinogène de l'hexogène n'a pas été mis en évidence chez le rat (USEPA, 1993). Toutefois, l'hexogène est considéré par l'US EPA comme un composé appartenant au groupe C des carcinogènes humains potentiels. La dose maximale dans l'eau potable a été fixée à 3,1 µg/L.

Les études de toxicité réalisées sur les métabolites de l'hexogène sont limitées. Les effets du MNX (hexahydro-1-nitroso-3, 5-dinitro-1, 3, 5-triazine), du DNX (hexahydro-1, 3-dinitroso-5-nitro-1, 3, 5-triazine) et du TNX (hexahydro-1, 3, 5-trinitroso-1, 3, 5-triazine) ont été mesurés sur la survie et la reproduction du criquet *Acheta domesticus*. Si le MNX et le TNX semblent ne pas avoir d'impact ni sur leur survie, ni sur la production de leurs œufs, ces 2 molécules ont une influence directe sur l'éclosion. En effet le nombre d'éclosions diminue lorsque la concentration en MNX et en DNX augmente (Zhang *et al.*, 2006). Des études ont

été menées sur les effets du MNX et du TNX sur la reproduction des vers de terre *Eisenia andrei* et ont révélé une inhibition de la reproduction ainsi que de l'éclosion des cocons.

b) Toxicité de l'octogène

Robidoux *et al.* (2001), ont décrit des effets significatifs de l'octogène sur la croissance et la reproduction du ver de terre, *Eisenia andrei*. En effet, le HMX a un impact significatif sur la reproduction des vers de terre aux concentrations supérieures à 3,013 mg/kg de sol. Des études menées chez le rat et la souris ont montré qu'une ingestion d'octogène était suivie d'effets toxiques incluant l'hyperkinésie⁴ et des convulsions. Des études ont montré que les DL 50 de l'octogène étaient de 5500 et 6400 mg/kg pour des rats mâles et femelles, 1700 et 3200 mg/kg pour des souris mâles et femelles et 100-250mg/kg pour des lapins (Cuthbert *et al.*, 1985). Contrairement à l'hexogène, lors d'une administration orale, la majorité de l'octogène est excrétée dans les fèces (70% chez la souris, 85% chez le rat). De tels résultats peuvent s'expliquer par la faible solubilité de l'octogène dans l'eau (5mg.L⁻¹).

Des études récentes ont montré que l'octogène est rapidement transféré de la femelle de la caille (*Colinus virginianus*) jusqu'aux œufs (Brunjes *et al.*, 2007). Des études réalisées sur des espèces aquatiques ont montré des effets semblables sur des algues, des poissons et des invertébrés. La CL50 de l'octogène à 96h sur la perche soleil, (*Lepomis macrochirus*), le poisson chat (*Ictalurus punctatus*) et la truite (*Oncorhynchus mykiss*) est supérieure à 32 mg/L à 24, 48 et 96 heures. La CL50 à 96 heures est de 15mg/L pour le vairon (*Pimephales promelas*); la CL50 à 24 et 48 heures pour la crevette (*Gammarus fasciatus*) et la Daphnie (*Daphnia magna*) sont supérieures à 32 mg/L (Bentley *et al.*, 1977).

c) Toxicité du TNT

Une étude a été réalisée pour déterminer la toxicité aiguë du TNT chez 5 espèces d'invertébrés aquatiques (*Brachionus calyciflorus*, *Lumbricus variegatus*, *Daphnia magna*, *Hyallela azteca* et *Tanytarsus dissimilis*) et 4 espèces de poissons (*Ictalurus punctatus*, *Lepomis macrochirus*, *Pimephales promelas* et *Oncorhynchus mykiss*) (Liu *et al.*, 1983). La CL50 a été déterminée au bout de 48 h pour les invertébrés et 96 h pour les poissons. Cette concentration variait entre 1,5 et 29 mg/L. Le développement des larves de moules *Mytilus*

⁴ Hyperkinésie : Mouvement involontaire de nature non épileptique qui comprend plusieurs variétés dont les tremblements.

galloprovincialis a également été étudié en présence de TNT (Rosen et Lotufo, 2007). Dans ces conditions expérimentales, la CE50 s'élève à 0,75mg.L⁻¹. Une autre étude sur le poisson *Lepomis macrochirus* a permis d'évaluer la CE50 du TNT à 96 h à 0,46 mg/L (Smock *et al.*, 1976). Les effets observés étaient un état de léthargie suivi d'une perte de motricité.

Des études récentes ont montré que le TNT diminuait la fécondité chez le ver de terre *Eisania andrei* si sa concentration dépassait 110 mg/kg de sol (Robidoux, 2002).

Un bilan de la toxicité de l'hexogène, de l'octogène et du TNT sur différents organismes est donné dans le Tableau 3.

Tableau 3 : Données toxicologiques pour l'hexogène, l'octogène et le TNT (données non exhaustives).

	CL50	DL50	CE50	Concentration	Espèce	Référence
Hexogène	X			22,9 mg/L à 96h	Poisson zèbre (<i>Danio rerio</i>)	Mukhi, 2005
			X	20,8 mg/L à 96 h	Poisson zèbre (<i>Danio rerio</i>)	Mukhi, 2005
		X		86 à 97 mg/kg	Souris (<i>mus musculus</i>)	Cholakis <i>et al.</i> , 1980
Octogène		X		5500mg/kg	Rat male(<i>Rattus norvegicus</i>)	Cuthbert <i>et al.</i> , 1985
		X		100mg/kg	Lapin (<i>Oryctolagus cuniculus</i>)	Cuthbert <i>et al.</i> , 1985
	X			>32 mg/L	Poisson chat (<i>Ictalurus punctatus</i>)	Bentley <i>et al.</i> , 1977
TNT			X	0,46 mg/L	Perche soleil (<i>Lepomis macrochirus</i>)	Smock <i>et al.</i> , 1976
	X			De 1,5 à 29 mg/L	Daphnie (<i>Daphnia magna</i>), Truite (<i>Oncorhynchus mykiss</i>)	Liu <i>et al.</i> , 1983
			X	0,75mg.L ⁻¹	Moule (<i>Mytilus galloprovincialis</i>)	(Rosen et Lotufo, 2007)

d) Toxicité des produits de métabolisation des explosifs

Beaucoup de contaminants peuvent former des produits de dégradation plus toxiques, plus stables et plus solubles que les produits initiaux. La cytotoxicité des métabolites majeurs du TNT (4-HADNT, 2-ADNT, 4,4',6,6'-tétranitro-2,2'-azoxytoluène et 2,2',6,6'-tétranitro-4,4'-azoxytoluène) a été étudiée sur des cellules H4IIE (cellules de foie de rat) et CHO-K1 (cellules ovariennes de hamster) (Honeycutt *et al.*, 1996). La CL50 du TNT était de 24 µg/mL. Sur ces lignées cellulaires, les quatre métabolites testés se sont révélés aussi cytotoxiques que le TNT, entre 3 et 18 µg/mL. Les dérivés aminés qui résultent de la dégradation microbiologique partielle représentent un problème aussi important que le TNT. Ils sont plus stables dans l'environnement, souvent aussi toxiques et plus mobiles, ce qui représente une menace pour les réserves d'eau potable, la santé humaine et l'environnement (Snellinx *et al.*, 2002).

D'autres produits de dégradation des explosifs sont connus pour avoir des propriétés cancérogènes ou mutagènes. Ainsi, le 1,2- diméthylhydrazine, un produit de dégradation anaérobie de l'hexogène, est répertorié comme inducteur de cancer chez les rats exposés (Fiala, 1977).

L'hexogène et l'octogène possèdent des groupements nitrés mais contrairement aux autres composés énergétiques, ils sont reliés au cycle par une liaison covalente azote-azote. Cette distinction est importante car contrairement aux composés nitrés aliphatiques ou aromatiques, ils ne peuvent pas être synthétisés par des plantes ou des micro-organismes.

II. Pesticides

A. Domaines d'application

La vocation première des pesticides utilisés en agriculture est de protéger les cultures, de contrôler l'infestation et la propagation des ennemis de ces cultures c'est à dire de tuer par intoxication les êtres autres que la plante cultivée. Leur utilisation est nécessaire pour maintenir un niveau de production et de qualité, compatibles avec la demande et/ou les besoins. Les pesticides en général posent problème en raison de leur manque de sélectivité vis-à-vis de leur cible, et de leur potentielle dispersion dans d'autres compartiments de l'environnement (Barriuso *et al.*, 1996).

Parmi les pesticides et selon leur fonction, on distingue communément : les herbicides, les fongicides, les insecticides, les algicides, les nématocides, etc. Les herbicides et les fongicides

sont les pesticides les plus utilisés. On compte actuellement 960 formulations de pesticides agréés en France (Karg, 2001). Chaque année, 20 à 30 produits sont interdits et remplacés par en moyenne 40 à 60 autres. En France, plus de 200 substances actives différentes de produits phytosanitaires sont observées dans les eaux superficielles et souterraines, à des teneurs variables, sans toutefois permettre de conclure sur les tendances globales d'évolution de la pollution (IFEN, 2004).

Dans le cadre des futures réformes, il est prévu de diviser par deux le nombre de molécules synthétisées. L'enjeu pour les années à venir sera de développer la recherche pour des molécules plus spécifiques, moins rémanentes et réellement biodégradables (y compris métabolites et produits dérivés). Toutefois, la plupart des produits interdits depuis de nombreuses années sont toujours présents dans notre environnement, comme par exemple le DDT et le lindane (Karg, 2001) ou encore l'atrazine interdit depuis 2003 qui reste l'un des contaminants majeurs des nappes phréatiques et des cours d'eau (IFEN, 2004).

Les dinitrophénols ont un spectre d'action très large et par conséquent ont des usages multiples industriels, agricoles, intermédiaires de teinture, traitement du bois, médicaments amincissants (Gasiewicz, 1991). Les dinitrophénols en tant qu'herbicides sélectifs sont utilisés pour le désherbage des céréales, des légumineuses et des graminées fourragères.

B. Mode d'action des Dinitrophénols

Escher (1995) a montré que ces polluants peuvent agir comme inhibiteurs enzymatiques, comme agents découplants de la phosphorylation oxydative des mitochondries et comme agents narcotiques.

Le Dinoseb est un herbicide de contact qui agit rapidement par diffusion à travers les surfaces externes ou sous forme de vapeur par les stomates. Le Dinoseb provoque ainsi un changement dans le métabolisme du végétal. L'énergie libérée non stockée sous forme d'ATP est dégradée en chaleur qui déborde les mécanismes de thermorégulation (Escher, 1995).

Le mode d'action du Dinoterb se réalise par pénétration foliaire et racinaire, ainsi que par translocation. Sur un plan biologique, le Dinoterb exerce un effet désorganisateur des membranes lipidiques (Pont et Collet, 1983). En effet, ce dernier peut altérer l'organisation des membranes par inhibition de la synthèse des lipides membranaires.

C. Caractéristiques physico-chimiques

Les dinitrophénols sont des composés peu hydrosolubles, de couleur jaune ou orange intense dû à leur structure nitrobenzène (encore appelés "colorants nitrés"). Les principaux dérivés nitrés des phénols sont le DNOC (DiNitro Ortho Crésol), le Dinoseb, le Dinoterb, le trifluraline (herbicide à base de dinitroaniline), la benfluraline et le nitalin. Les caractéristiques physico-chimiques du Dinoseb et du Dinoterb sont données en annexe I.

a) Le Dinoseb

Le Dinoseb (Figure 6) se comporte comme un acide faible ceci étant dû à la présence d'un groupement phénol. Dans un milieu neutre (pH=7), les formes ioniques et non ioniques sont présentes. Sa forme dissociée, utilisée dans la formulation des pesticides, est nettement plus soluble dans l'eau que sa forme neutre, c'est pourquoi il est relativement fréquent de le trouver dans les eaux après un épandage (Spack, 1997).

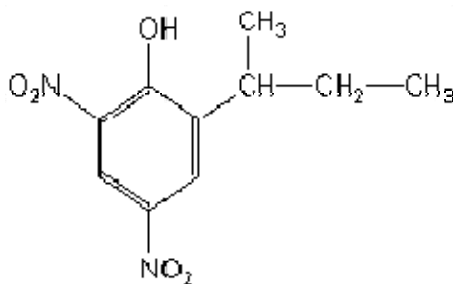


Figure 6 : Structure chimique du Dinoseb

Concernant la synthèse du Dinoseb, il y a tout d'abord une étape de sulfonation dans l'acide sulfurique de l'OSBP (ortho secondaire butyl phenol) puis une réaction de substitution (procédé similaire pour la fabrication d'acide picrique) qui libère de l'eau et l'acide sulfurique. Dans des conditions d'épandage adaptées au besoin, le Dinoseb ne persiste pas dans le sol (Hammill et Crawford, 1996). Pourtant, une autre étude menée par O'Neill en 1989 fait état de 44 ppb de Dinoseb retrouvés dans les eaux de drainage 10 jours après application, et de résidus détectables 1 an après application. De plus, dans les aires de stockage et au niveau de sites de pollution accidentelle (déversement), le Dinoseb peut persister dans le sol et contaminer les eaux souterraines (O'Neill, 1989). Mais dans les sols, le Dinoseb est relativement peu persistant; son temps de demi-vie a été évalué à 31 jours (Chevre, 2000). Lorsque le Dinoseb est accompagné d'autres nitrophénols (Dinoterb, DNOC, Dinitrophenol) dans un sol, son temps de demi-vie est multiplié par 3,7 (Martins et Mermoud, 1998).

b) Le Dinoterb

D'usage moins connu, le Dinoterb (Figure 7) comme le Dinoseb possède des propriétés d'acide faible.

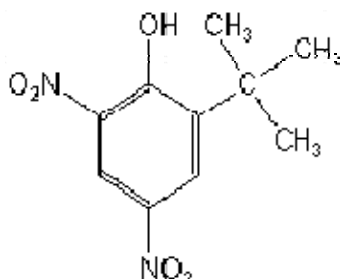


Figure 7 : Structure du Dinoterb

La synthèse du Dinoterb peut se faire par un procédé proche du Dinoseb ou la nitration peut se faire en présence d'acide nitrique seul (acide nitrique dilué). Dans ce cas le rendement n'est pas très bon.

Le temps de demi-vie du Dinoterb dans le sol est estimé à 30 jours (Martins et Mermoud, 1998). Le temps de demi-vie du Dinoterb dans un milieu contenant d'autres nitrophénols (DNOC, Dinoseb et Dinitrophénol) est multiplié par 3.

D. Toxicité

Certaines molécules de la famille des dinitrophénols à savoir le 2-nitrophénol, le 4-nitrophénol et le 2,4-DNP (ayant des propriétés explosives) sont classées comme polluants prioritaires depuis plus de 30 ans (US EPA, 1976). Les composés nitroaromatiques sont des composés hautement toxiques pour les hommes et les animaux et présentent des DL50 allant de 25 à 50 mg/kg. La plupart des nitrophénols sont facilement absorbés par la peau, le tractus intestinal et les poumons lorsque de fines gouttes sont inhalées (Finkel, 1983).

La toxicité se manifeste par la stimulation du métabolisme oxydatif dans les mitochondries par découplage de la phosphorylation oxydative. Cela conduit à des symptômes d'hyperthermie et de tachycardie, à des maux de tête, des malaises, de la déshydratation, ainsi qu'à une diminution des réserves en sucre et en graisses à long terme (Kurt *et al*, 1986).

Le Dinoseb a été définitivement interdit dans la plupart des pays (United Nation Environment Programm, 2006). En Suisse, il a été utilisé jusqu'en 2002 comme défoliant des pommes de terre. (Station fédérale de recherches en arboriculture, viticulture et horticulture, 2002). Interdit aux Etats-Unis depuis 1986 (Extoxnet 1999), il entre cependant toujours dans

la composition de plus de 180 produits agrochimiques américains. Il a été interdit en France en 1995 (Chevre, 2000).

- Toxicité aiguë

Chez l'homme, le Dinoseb est fortement toxique par ingestion ou par contact avec la peau. Le contact direct avec cette dernière peut causer des irritations, des taches, des brûlures ou des effets nettement plus graves comme des nausées, diarrhées, maux de tête qui peuvent persister longtemps après l'exposition. Le produit chimique est excrété par les déjections et/ou métabolisé par le foie. On trouve des produits de dégradation dans les reins, le foie, la rate, le sang et l'urine. Il peut également passer au travers du placenta dans le fœtus (Extoxnet, 1999).

- Toxicité chronique

Le Dinoseb agit d'une manière similaire chez tous les organismes en bloquant notamment la formation d'ATP, (Adénosine TriPhosphate) donc d'énergie dans la cellule. Le Dinoseb semble avoir des effets sur la reproduction chez le rat et la souris à des concentrations auxquelles les travailleurs peuvent être exposés. Ses effets toxiques se manifestent par une baisse de la quantité et de la qualité du sperme, ainsi que par une faible survie des nouveaux nés.

Il a été montré que le Dinoseb a des effets défavorables sur la fertilité ainsi que des effets tératogènes sur les mammifères. Le Dinoseb est toxique chez les poissons, les valeurs de CL50-96h variant de 44µg/L (truite de lac) à 118 µg/L (poisson-chat). De même, la CL50 à 96h d'exposition au Dinoseb a été évaluée à 70,6 µg/L chez l'alevin de saumon et 87% de mortalité sont observés chez ces alevins après 96h d'exposition à 100 µg/L de Dinoseb (Viant *et al.*, 2006). Il présente donc un danger réel pour le milieu aquatique. S'il est rapidement assimilé, il est également rapidement éliminé lorsque les poissons se retrouvent en milieu non contaminé. Il présente peu de risque de bioaccumulation (Extoxnet 1999). Chez les microcrustacés et les algues, le Dinoseb est légèrement moins toxique. La CE50 chez *Daphnia magna* varie de 0,3 à 0,68 mg/L. Chez les algues, les effets diffèrent d'une espèce à l'autre. Il inhibe de 50% la croissance à 1,03 mg/L et 50% de la photosynthèse à 0,432 mg/L chez *Chlorella pyrenoidosa*, mais est sans effet à 2,4 mg/L chez *Anabaena variabilis*. Dans les deux cas, la respiration n'est pas fortement affectée en dessous de 2,4 mg/L (Hawxby *et al.*, 1977). Des collemboles *Folsomia candida* exposés à des concentrations en Dinoseb de 25µg/g de sol sec après 21 jours d'exposition voient leur poids, leur taille et leur contenu lipidique diminuer. De plus, à cette concentration, une diminution de la survie de 50% des individus est observée (Staempfli *et al.*, 2007).

Le Dinoterb est interdit en France depuis le 30 septembre 1997. Les produits à base de Dinoterb sont interdits dans la plupart des pays Européens depuis 2001. Ce composé a depuis été utilisé comme substance de référence pour effectuer des études sur l'influence du type de sol et de la température sur les effets des pesticides (Beulke et Malkolmes, 2001).

En terme de toxicité dans le règne animal, le Dinoterb est hépatotoxique, chez le rat à partir de 2,4 mg/L. Il devient encore plus toxique une fois métabolisé (24h d'incubation en présence d'hépatocytes de rats). Le Dinoterb est également hautement toxique chez le poisson (*Oncorhynchus mykiss*), avec une CL50 de 3,4 µg/L. La DL50 a été fixée à 62mg/kg chez le rat, 25mg/kg chez la souris et 28 mg/kg chez le lapin (Sawicki *et al.*, 1998). Des études chez l'embryon d'huître *Crassostrea gigas* et d'oursin *Paracentrotus lividus* ont montré une CE50 à 72,2 µg/L et à 200µg/L respectivement (His *et al.*, 1999). De plus, le pourcentage d'anormalités durant l'embryogenèse augmente à partir de 200µg/L de Dinoterb, aucun développement embryonnaire n'est observé à partir de 250µg/L. Des tests réalisés sur des particules submitochondriales de cœur de bœuf ont montré une CE50 de 0,041 mg/L pour le Dinoterb (Argese *et al.*, 2005). Un résumé des études de toxicité réalisées sur le Dinoseb et le Dinoterb est présenté sur le Tableau 4.

Tableau 4 : Données toxicologiques pour le Dinoseb et le Dinoterb

	CL50	DL50	CE50	Concentration	Espèce	Référence
Dinoseb	X			44µg/L	Truite (<i>Oncorhynchus mykiss</i>)	Viant <i>et al.</i> , 2006
	X			70,6µg/L	Alevin de saumon (<i>Salmo salar</i>)	Viant <i>et al.</i> , 2006
			X	0,3 à 0,68 mg/L	Daphnie (<i>Daphnia magna</i>)	Hawxby <i>et al.</i> , 1977
			X	0,041mg/L	Bœuf (<i>Bos primigenius</i>) (mitochondries)	Argese <i>et al.</i> , 2005
Dinoterb	X			0,0034mg/L	Truite (<i>Oncorhynchus mykiss</i>)	Sawicki <i>et al.</i> , 1999
		X		62mg/kg	Rat (<i>Rattus norvegicus</i>)	Sawicki <i>et al.</i> , 1999
			X	72,2µg/L	Embryon d’huître (<i>Crassostrea gigas</i>)	His <i>et al.</i> , 1999
			X	0,041mg/L	Bœuf (mitochondries)	Argese <i>et al.</i> , 2005

Comme on peut le voir dans ce chapitre, l’ensemble des produits étudiés présentent deux caractéristiques importantes : (i) une forte rémanence dans les milieux naturels et (ii) une toxicité importante pour les organismes vivants. D’autre part, leur association semble accroître leur rémanence. Aussi, il est important de pouvoir traiter ces composés de manière à limiter leurs transferts dans l’environnement pour prévenir de leurs effets délétères.

Chapitre 2.

Les procédés de dépollution

Un site pollué est un site qui, du fait d'anciens dépôts de déchets ou d'infiltrations de substances polluantes, présente une pollution susceptible de provoquer une nuisance ou un risque pour les personnes ou l'environnement (MATE, 1996).

Le recensement des différents types de polluants est relativement récent, l'homme n'ayant pris conscience que très tardivement que la planète ne pouvait être assimilée à un être vivant pouvant ingérer indéfiniment les nombreuses substances polluantes qu'elle recevait. Une classification commune et courante nous amène à distinguer deux grandes familles : les composés inorganiques et les composés organiques (Legrand, 2006).

Les composés inorganiques sont principalement composés de métaux, également appelés « éléments traces métalliques ». Les éléments chimiques qui les constituent peuvent se retrouver à l'état naturel dans l'environnement dans la roche mère (Legrand, 2006). L'activité humaine contribue également à augmenter leur concentration par le stockage de déchets industriels et urbains, les diverses pratiques agricoles et les retombées atmosphériques provenant des usines. D'autres composés inorganiques peuvent être recensés, à savoir les cyanures (traitements des minerais, laurier rose), les nitrates et nitrites (engrais et autres xénobiotiques), les fluorures (industrie métallurgique et chimique).

Les composés organiques représentant la majeure partie de la pollution peuvent être décrits en 4 familles : les hydrocarbures ou huiles minérales, les produits organiques industriels, les pesticides, ainsi que les substances militaires (Legrand, 2006). La présence dans l'environnement de ces composés organiques est principalement due aux activités humaines telles que les activités industrielles (production de phytosanitaires, d'hydrocarbures,...), et agricoles (utilisation de fertilisants, d'engrais, de produits phytosanitaires).

La France n'a pris conscience que très récemment de l'importance des sites contaminés, alors que les USA, les Pays Bas et l'Allemagne Fédérale ont entrepris depuis plus de 20 ans le recensement des sites susceptibles de poser des problèmes environnementaux (Lecomte, 1998). Dans l'objectif de référencer les sites et sols pollués (ou potentiellement pollués) en France, une base de données, Basol, a été mise en place, appelant une action des pouvoirs publics, à titre préventif ou curatif. Ainsi, de nombreuses usines, friches industrielles, décharges, anciennes usines à gaz présentant des difficultés du point de vue de la réhabilitation de leurs sites de proximité, sont recensées par les organismes publics tels que les préfetures et les DRIRE. Tableau de bord des actions de l'administration dans ce

domaine, Basol permet de s'informer sur les opérations menées par l'administration et les responsables de ces sites pour éviter les risques et les nuisances. Cet inventaire a pour vocation d'être mis à jour (Figure 8). Ainsi, 1 023 sites étaient référencés en 1996 en France, 3 354 début 2002, 3 819 en juin 2006 (<http://www.afsset.fr/>), et environ 3900 en janvier 2007 (<http://www.environnement.ccip.fr/index.htm>).

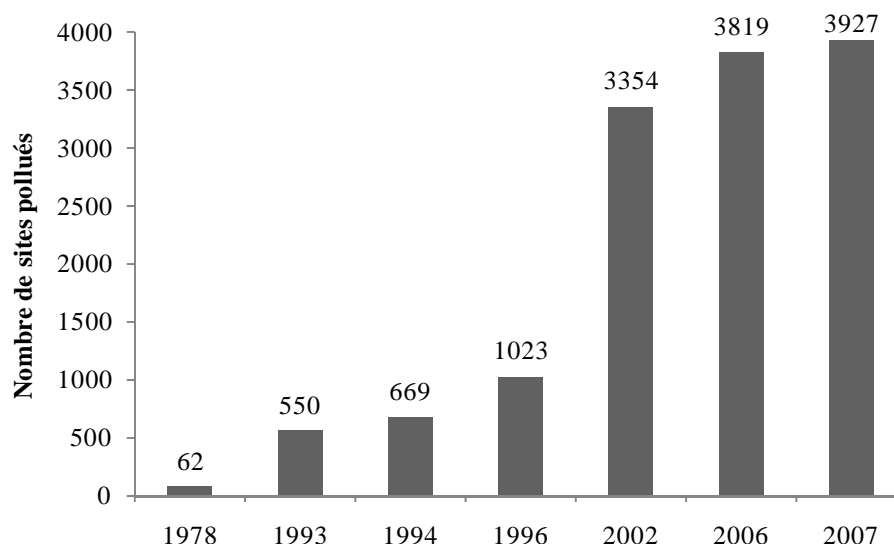


Figure 8 : Evolution des sites pollués répertoriés en France entre 1978 et 2007.

(Ministère de l'Environnement, ADEME, <http://www.afsset.fr>, <http://www.environnement.ccip.fr/index.htm>)

Concernant les produits pyrotechniques, plus de 12000 sites contaminés par des explosifs, nécessitant une décontamination, ont été recensés récemment aux USA (Zhang *et al.*, 2006). La plupart d'entre eux comportent un risque supplémentaire lié au transfert éventuel des explosifs jusqu'aux nappes phréatiques. Pas moins de 2000 sites de production d'explosifs et de stockage sont recensés en Europe (Adrian *et al.*, 2003). Un exemple de concentrations en explosifs retrouvées dans les sols d'une usine est présenté dans le Tableau 5. L'hexogène et l'octogène se retrouvent conjointement sur les sites contaminés. Ces deux produits sont classés comme polluants organiques persistants dans l'environnement. Si une partie importante de la pollution des sols par les explosifs provient des sites militaires (guerre ou essais), une contamination est également apportée par les sites de production *via* les effluents de synthèse (Talmage *et al.*, 1999; Beller et Tiemer, 2002). Le TNT, l'hexogène et l'octogène sont régulièrement retrouvés dans des lagunes de décantation après des opérations de production, de chargement, et de transfert de produits dangereux (Funk *et al.*, 1993).

Ces opérations ont engendré une contamination de quantités importantes des sols, pouvant même se propager aux sols environnants et contaminer les nappes phréatiques. Bien que les lagunes de décantation ne soient plus d'actualité, des quantités importantes de sols contaminés (comportant un risque potentiel à la fois toxique et pyrotechnique) doivent aujourd'hui être nettoyés.

Tableau 5 : Concentrations d'explosifs retrouvées dans des sols d'usine.
(Funk *et al.*, 1993 ; Simini *et al.*, 1995, Zhang *et al.*, 2006)

Composés explosifs	Gamme de concentration (en mg/kg)
TNT (Trinitrotoluène)	4 000-100 000
TNB (Trinitrobenzène)	175-300
Hexogène (hexahydro-1,3,5-trinitro-1,3,5-triazine)	50-3 000
Octogène (octahydro-1,3,5,7-tetranitro-1,3,5,7-tetrazocine).	50-3 000

I. Les différentes méthodes de dépollution

Le but de la dépollution des sols est de restituer les sites dans un état aussi proche que possible de l'état antérieur à la pollution. En outre, la ou les techniques de traitement des sols ne doivent pas être plus polluantes que le résultat de la dépollution. C'est-à-dire qu'il ne doit pas y avoir de transfert de pollution. Ainsi le laboratoire Central des Ponts et Chaussées a dès 1994 donné une liste des critères auxquels doivent répondre les techniques de dépollution :

- enlever ou neutraliser les matières incriminées,
- peser aussi peu que possible sur les ressources mises en œuvre (eau, air, énergie, capital...)
- ne pas provoquer d'émissions secondaires (eau et air du processus) contenant des polluants.
- obtenir un taux important de recyclage du matériau traité,
- minimiser la quantité et le danger potentiel des matières résiduelles,
- ne pas produire de nouvelles substances toxiques par l'enlèvement ou le transfert de celles déjà existantes.

La dépollution des sites contaminés par des sources de pollution variées est contrainte par différents facteurs, la nature de la pollution étant le premier. Toutefois, la dépollution d'un site encore en activité sera beaucoup plus contraignante que celle d'un site fermé (Legrand, 2006). Les traitements proposés peuvent être définis en trois grandes familles :

- les procédés « *in situ* », réalisés dans le sol en état ;
- les procédés « on site », traitements sur place des sols excavés ;
- les procédés « hors site » ou « off site » ou « *ex situ* », nécessitant l'évacuation.

Ces différents procédés sont dépendants d'un facteur de temps, sachant que les traitements « *in situ* » demandent un temps plus long que ceux réalisés hors site. Enfin, le type de traitement choisi dépendra également de la nature du ou des polluants, certains d'entre eux présentant la caractéristique d'être biodégradables et d'autres non.

Ainsi trois méthodologies peuvent s'appliquer pour le traitement de polluants non biodégradables :

- Les traitements physico-chimiques ;
- Les traitements thermiques ;
- Les méthodes de confinement.

Ces trois méthodologies s'appliquant essentiellement pour le traitement de polluants non biodégradables, nous exposerons dans un quatrième temps les techniques liées à la biodégradation.

A. Les procédés physico-chimiques

Les traitements classiques de dépollution des sols contaminés par des composés organiques sont essentiellement basés sur des méthodes physico-chimiques : la neutralisation chimique, l'incinération, l'adsorption sur charbon actif ou sur résines, la lixiviation des sols par des solvants ou encore la photo-oxydation (UltraViolet UV/Ozone O₃) (Oh *et al*, 2004). Bien qu'elles diminuent les concentrations en polluants, ces méthodes ne restaurent pas les sols et ont la plupart du temps un effet néfaste sur l'activité biologique et la fertilité des sols traités.

La technique physique la plus répandue actuellement consiste à injecter des fluides dans le sol afin de transférer et concentrer la pollution vers des points de récupération. Cette technique de « lavage des sols » préalablement excavés, peut être réalisée à pression normale

ou haute pression. L'eau est ensuite dépolluée par passage dans une station d'épuration adaptée au polluant, l'air chargé en vapeurs toxiques est filtré sur charbon actif. Cette méthode s'adresse à la plupart des polluants sur sols grenus. Elle atteint des rendements de 80 % et peut être améliorée si elle est associée à un traitement biologique ou en ajoutant des tensioactifs.

D'autres techniques font appel à des systèmes d'extraction sous vide ou « venting » ou par injection d'air ou de vapeur « stripping ». Le principe du venting repose sur la mise en dépression du sol contaminé par l'intermédiaire d'une pompe à vide. Il y a alors aspiration de vapeurs polluées qui peuvent être traitées par oxydation catalytique, par condensation réfrigérée ou par adsorption sur charbon actif. Cette technique s'applique essentiellement aux produits volatils ou semi-volatils. Efficace sur sols sablonneux, elle perd de son efficacité sur les sols argileux. Le stripping s'adresse essentiellement aux composés très volatils (solvants chlorés) sur des sols sablonneux ou graveleux. Il s'agit d'injecter de l'air ou de la vapeur sous pression dans les sols. Des puits d'extraction permettent de récupérer les vapeurs toxiques qui sont ensuite traitées sur filtre à charbon.

Pour l'extraction des métaux et des petites molécules organiques chargées, il existe des procédés électriques. Le principe repose sur la circulation d'un courant électrique dans le sol par l'intermédiaire d'électrodes poreuses. Le procédé sera d'autant plus efficace que le sol aura une grande teneur en eau et un pouvoir tampon faible. Cette technique nécessite une excavation du sol, le traitement est réalisé *on-site*.

Les techniques d'ordre chimique consistent à détruire, fixer ou neutraliser les polluants par l'introduction de composés chimiquement actifs. Toutefois ces techniques s'appliquent difficilement aux matrices solides, et nécessitent de bien connaître la nature du réactif et du sol. En effet, leur utilisation non maîtrisée pourrait générer d'autres formes de pollution. A l'heure actuelle, il existe un très grand nombre de procédés chimiques qui permettent d'éliminer la majeure partie des polluants. Cependant les coûts et l'efficacité des traitements sont très différents d'un produit à un autre. L'extraction par solvant est la technologie la plus simple et donnant les meilleurs résultats. On utilise comme solvant organique des alcanes, des alcools ou des cétones qui permettent de dissoudre la plupart des polluants organiques toxiques. Le solvant est introduit sur le sol préalablement excavé. Il solubilise alors les polluants qui passent dans la phase organique. Le solvant est alors extrait.

D'autres exemples peuvent également résulter de l'adaptation de deux ou trois principes de fonctionnement permettant d'améliorer les rendements de dépollution.

B. Les traitements thermiques

Dans le cadre de ces techniques physiques existent aussi des traitements thermiques qui peuvent être réalisés sur le site même « on-site » ou sur des sites appropriés « hors-site » comme une usine d'incinération. Cette technique est adaptée aux sols contaminés par des composés organiques facilement oxydables et convertibles en CO₂ et H₂O. Il est nécessaire de procéder à une excavation des sols, un broyage, un tamisage avant le traitement thermique.

Il existe deux méthodes de chauffage :

- le chauffage direct, le sol est chauffé à 1000°C directement en introduisant de l'oxygène,
- le chauffage indirect, le sol est dans un four étanche et n'est pas en contact avec la source de chaleur. La température avoisine les 800°C et est suffisante pour extraire les polluants par l'intermédiaire des vapeurs se dégageant.

Ces deux méthodes sont très efficaces, mais très coûteuses en énergie. Il existe à l'heure actuelle plusieurs types de fours.

C. Les méthodes de confinement.

Le confinement est plus une solution qu'une méthode de dépollution. Cette méthode permet le traitement de surfaces importantes et de polluants multiples. La pollution n'est donc pas enlevée ni supprimée, le confinement ayant pour objectif d'en réduire les effets sur la santé de l'homme et sur l'environnement (Legrand, 2006). Le confinement peut s'appliquer selon trois méthodologies :

- Le confinement de surface avec mise en place d'une géomembrane ;
- Le confinement vertical, derrière des parois étanches en béton, matériaux rétenteurs ou mortiers plastiques ;
- Le confinement horizontal profond.

II. Les procédés biologiques

Des méthodes biologiques s'appuient sur le métabolisme et l'activité des communautés de bactéries, champignons, végétaux supérieurs, pour évacuer, dégrader ou stabiliser les polluants.

A. La phytodépollution

La phytodépollution utilise des plantes afin de dépolluer le sol et l'eau du sol en tirant avantage des capacités des plantes pour extraire, accumuler et/ou dégrader les constituants de leur environnement. La bioremédiation assistée par les plantes, assimilée parfois à un type de phytoremédiation implique l'interaction des racines et des microorganismes associés aux systèmes racinaires. Cette technique permet de dépolluer les sols contenant des concentrations élevées en composés organiques (Miller, 1996). La technique de phytodépollution est une technologie de dépollution qui semble efficace vis-à-vis d'un large spectre de polluants organiques et inorganiques. Elle peut être utilisée sur des substrats solides (sols pollués), liquides (eaux contaminées) ou gazeux (filtration d'air chargé en composés nocifs volatils) (Pilon-Smits, 2005). Les principaux mécanismes de phytodépollution sont la phyto-extraction, la phyto-dégradation, la rhyzo-dégradation et la phyto-stabilisation (Vila, 2006). Le principal inconvénient de la phytodépollution est la durée du traitement qui peut s'étendre sur plusieurs dizaines d'années. Bien que développée dans d'autres pays, cette solution n'est actuellement pas appliquée en France.

B. La bioremédiation

La bioremédiation est basée sur l'utilisation de souches microbiennes (bactéries et/ou champignons) et consiste à utiliser ces dernières afin de dégrader des contaminants (Boopathy, 2000). Au stade actuel de décontamination, la bioremédiation est utilisée depuis un peu plus de dix ans afin d'éliminer divers composés anthropogéniques ou d'origine naturelle présents dans l'environnement. Cette technique a de multiples applications, incluant le nettoyage des eaux du sol, du sol, de boues industrielles. Il existe des micro-organismes capables de dégrader efficacement des polluants comme les produits pétroliers, les huiles et les graisses, les hydrocarbures mono et polycycliques, les BPC (biphénylpolychlorés), etc. En plus d'éliminer les composés ayant des effets néfastes pour l'environnement, cette technique permet de diminuer les coûts d'assainissement (Biogénie, 1994). Les microorganismes ont besoin de nutriments et de source carbonée pour fournir l'énergie nécessaire à leur croissance et leur survie. La bioremédiation doit faire face à un environnement hétérogène dans lequel la plupart du temps, le(s) contaminant(s) est (sont) présent(s) en association avec des particules du sol, dissous dans la solution du sol, etc. Pour cette raison, la bioremédiation se doit d'avoir

une approche pluridisciplinaire, prenant ainsi en compte la microbiologie, l'ingénierie, l'écologie, l'écotoxicologie, la pédologie et la chimie.

Plusieurs méthodes utilisent les microorganismes comme principal acteur de la bioremédiation (Ballerini *et al.*, 1998, Ademe). Tout comme les autres traitements, les procédés de bioremédiation peuvent être regroupés en 2 sous parties, la première consacrée aux traitements de dépollution « *in situ* », la seconde aux traitements « hors site ».

a) Les traitements « *in situ* ».

Les traitements « *in situ* » s'imposent dans les cas où les polluants ont pénétré profondément dans les sols, et sont répartis sur des surfaces importantes, rendant l'excavation trop coûteuse. Ces traitements visent à activer les processus de biodégradation, et à améliorer l'accessibilité des microorganismes à l'oxygène (Ballerini *et al.*, 1998).

1. Traitement biologique par aération de sol (ou bioventing)

Le bioventing est une technologie prometteuse qui consiste à stimuler la biodégradation *in situ* de polluants dans les sols, en fournissant à la microflore en place l'oxygène nécessaire. L'oxygène est apporté par l'injection d'air dans la zone contaminée. Afin que cette méthode soit efficace, il est nécessaire que le milieu poreux présente une bonne teneur en éléments minéraux, et un sol colonisé par des microorganismes adaptés à la pollution pour que la technique du bioventing soit envisageable.

2. Traitement des sols par injection d'eau oxygénée (H_2O_2)

Certaines bactéries peuvent utiliser H_2O_2 comme source d'oxygène jusqu'à des concentrations de 1g/L, ce qui représente des teneurs en O_2 50 fois plus élevées que celles mesurées dans une eau saturée avec de l'air. Ainsi, l'utilisation d' H_2O_2 a été envisagée pour le traitement de zones polluées. Ce traitement ne peut être avantageux que dans le cas où le sol contaminé est suffisamment perméable pour permettre une percolation efficace. L'addition d'eau oxygénée peut entraîner la précipitation du fer, pouvant provoquer un colmatage des sols. Il est important de maîtriser la décomposition de l'eau oxygénée. En effet, une décomposition trop rapide risque de sursaturer l'eau en O_2 qui va avoir tendance à dégazer et bloquer la circulation des fluides. Une décomposition trop lente réduit le métabolisme microbien et la vitesse de décontamination.

3. *Traitement des sols associés à celui de la nappe*

Ce type de traitement se traduit par un pompage de l'eau de la nappe, qui est traitée en surface (filtration, stripping, traitement biologique), souvent réaérée, additionnée de nutriments minéraux parfois avec des microorganismes avant d'être réinjectée dans le sol. L'injection de microorganismes peut se révéler nécessaire, dans le cas de polluants spécifiques ayant un microorganisme adapté à la dégradation.

b) Les traitements hors site

Les traitements hors site peuvent être utilisés dans le cas où les contaminants n'ont pas pénétré trop profondément, les sols peuvent alors être excavés puis traités. L'utilisation de ces procédés hors site permet la plupart du temps une réduction des durées de traitement (Ballerini *et al.*, 1998, Ademe).

1. *Traitement en réacteur ou bioslurry*

Le but de ce procédé est de mélanger les microorganismes et les polluants afin de faciliter leur dégradation. Pour les bioréacteurs en condition anaérobie, l'objectif final est de minéraliser le polluant ou de diminuer sa biodisponibilité ou celle des métabolites en les liant de façon irréversible à la matrice. Cette technologie n'est pas toujours très efficace et peut nécessiter des phases aérobies ainsi qu'un contrôle des flux hydriques à cause de la solubilité du polluant et de ses métabolites.

2. *Compostage*

Lors du compostage, le sol est mélangé avec des co-produits de l'agriculture (pailles de luzerne, tiges de betteraves à sucre et déchets végétaux). La mise en andains (tas allongés disposés sur une aire bétonnée), à l'air libre ou sous hangar, avec retournement mécanique, aération forcée et ajout de nutriments permet d'améliorer le rendement de la biodégradation naturelle en diminuant la durée du traitement de 3 à 9 mois selon le polluant. Cette biotechnologie est efficace pour diminuer la toxicité des sols mais elle nécessite des temps d'incubation longs et les coûts de mise en place et de maintenance sont élevés.

3. *Biotertre*

Le traitement en biotertre (ou biopile) consiste à stimuler ou optimiser le métabolisme de micro-organismes pour dégrader les polluants du sol. Cette technique est réalisée sous couvert, avec traitement des gaz et des jus produits (lixiviats), aération, humidification et addition de nutriments (azote et phosphore) au substrat à dépolluer. Des volumes importants

de matériaux pollués solides (plusieurs centaines de m³) contenant des hydrocarbures en relativement forte concentration (jusqu'à 5% ou 50 000 ppm) peuvent ainsi être traités pour la réhabilitation des sols pollués. La durée du traitement va de 5 à 12 mois selon la nature du polluant.

4. *Épandage contrôlé (ou landfarming)*

L'épandage contrôlé ou landfarming a été longtemps le seul procédé de biodégradation utilisé (à petite échelle) pour des matériaux pollués peu chargés en hydrocarbures (moins de 1 à 2 %). Il exige de grandes surfaces avec un plan d'épandage difficile à mettre en action (nombreux acteurs à convaincre et contrôles à réaliser). L'efficacité et la rapidité (un à deux ans) de la biodégradation varient notamment en fonction de l'aération du sol, de son humidité, de la bio-disponibilité des nutriments, de la richesse microbienne et de la température. La mise en culture favorise le métabolisme des micro-organismes. Le principal risque à maîtriser se rapporte à la migration du polluant dans le sol et l'entraînement par l'eau libre (ruissellement en surface, infiltration vers la nappe).

5. *Technique des zones humides ou « lagunage »*

Utilisée pour le traitement des eaux usées ou pour les eaux de mine, la technique du lagunage consiste à développer, en aval des zones génératrices de ces pollutions, des étendues au travers desquelles coulent les effluents.

Cette technique est un procédé d'épuration qui consiste à maintenir les eaux usées dans des étangs de faible profondeur pendant une longue période durant laquelle l'action des micro-organismes, des végétaux, du vent et du soleil, avec ou sans aération artificielle, provoque la dégradation lente des matières organiques. En aval de ce système, l'eau est en théorie de qualité acceptable et peut être envoyée telle quelle dans le réseau hydrologique.

Dans tous les cas, un suivi intensif et une évaluation finale (au niveau chimique et écotoxicologique) de la dépollution sont nécessaires pour la prise en compte de la protection de l'environnement (Ramos *et al.*, 2005). Ces traitements sont ainsi adaptés à des contaminations élevées en explosifs et relativement localisées, ils sont peu adaptés à des pollutions faibles et diffuses. De plus, cette technologie *ex situ* implique une altération de l'environnement difficile à remédier.

Comme nous venons de le voir, il existe un grand nombre de techniques différentes qui ont chacune une efficacité et un coût. Dans certains cas, la combinaison de plusieurs

méthodes est envisagée dans le but de dépolluer un sol. En fait il semble difficile de classer les différentes techniques quelque soit le critère de classification, car les sols et sites pollués sont tous différents. Les techniques doivent être adaptées au site et à la nature des polluants. Dans tous les cas, le degré de dépollution suit une courbe très caractéristique qui permet d'atteindre des rendements de dépollutions de 80 à 90% à des coûts modestes, mais il faut parfois multiplier par deux les délais et donc les coûts, pour atteindre 95%. En réalité une dépollution totale semble impossible à réaliser. Toutefois le site pourra être amené à une situation acceptable dans le cadre de la réglementation.

Un des problèmes majeurs dans la dépollution des sites pollués est le coût de revient très lourd des techniques physiques et chimiques qui impliquent dans la majorité des cas d'excaver les sols. Ces processus sont souvent hors de portée des PME. Les friches industrielles dans certains cas sont appelées à le rester durant encore de nombreuses années. Il est donc nécessaire de développer le plus rapidement possible des techniques moins coûteuses même si elles sont plus longues.

III. Bioremédiation des produits nitrés

Les études de bioremédiation *in situ* réalisées sur des sites contaminés par des explosifs sont extrêmement rares. La plupart du temps, les recherches sont menées en excavant une partie du sol contaminé pour travailler en laboratoire (Adrian *et al.*, 2007). Dans notre cas, le niveau de contamination est modéré (hexogène, 2.4 mg/kg de sol; octogène, 1.5 mg/kg de sol; et TNT, 3.8 mg/kg de sol). Les études qui suivent ont été réalisées sur des composés purs mis en présence d'espèces de bactéries isolées ainsi que sur des sols contaminés traités ex situ par certains procédés que nous avons décrits précédemment.

A. Les nitramines

En règle générale, l'hexogène et l'octogène peuvent être minéralisés (Hawari, 2000). Le Tableau 6 présente un résumé des principales études de biodégradation réalisées sur l'hexogène et l'octogène.

Tableau 6 : Etudes de biodégradation disponibles dans la littérature (liste non exhaustive)

Microorganisme	Conditions	Explosifs	Concentration initiale (en mg/L)	% de réduction	Temps (jours)	Référence
N/A	Anaérobie	hexogène	50	100	7	Mac Cormick <i>et al</i> 1981
<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	Aérobie	hexogène	0,0278	96	30	Fernando et Aust, 1991
<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	Aérobie	hexogène	41	56	2,7	Sublette <i>et al</i> 1992
<i>Morganella morganii</i>	Anaérobie	hexogène	73	100	27	Kitts <i>et al</i> , 1994
<i>Morganella morganii</i>	Anaérobie	octogène	14,81	60	45	
<i>Proteus rettgeri</i>	Anaérobie	hexogène	73	100	26	
<i>Proteus rettgeri</i>	Anaérobie	octogène	14,81	60	45	
<i>Citrobacter freundii</i>	Anaérobie	hexogène	73	85	45	
<i>Citrobacter freundii</i>	Anaérobie	octogène	14,81	50	45	
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	Aérobie	hexogène	66,6	100	7,1	Binks <i>et al</i> 1995

a) Biodégradation aérobie de l'hexogène et de l'octogène

En 1991, Fernando et Aust ont montré que *Phanerochaete chrysosporium*, dégradait l'hexogène sous conditions aérobies. Cette expérience a été menée avec du [¹⁴C]-hexogène sur une solution aqueuse et sur un sol. En culture liquide, seulement 4% du [¹⁴C]-hexogène marqué étaient présents pour 66% relargués sous forme de gaz carbonique (CO₂). Les expériences menées sur sol ont montré une meilleure minéralisation avec 76% de ¹⁴CO₂ produit. Dans cette étude, aucun métabolite n'a été mis en évidence. Lors d'essais de compostage en pile statique, il a été montré que l'hexogène n'était pas dégradé (Williams *et al*, 1992). Griest *et al*, (1993) ont réalisé un test de caractérisation chimique sur du compost en andain contaminé par des explosifs. Les auteurs ont démontré qu'un compostage en andain

non aéré était légèrement plus efficace qu'un compostage en andain aéré pour dégrader des explosifs tels que l'hexogène et l'octogène.

En 1995, Binks *et al* ont isolé une bactérie, *Stenotrophomonas maltophilia* PB1 issue d'un sol contaminé, capable d'utiliser l'hexogène comme seule source d'azote sous conditions aérobies. En effet, la dégradation de l'hexogène était synchronisée avec la croissance bactérienne. Une analyse sur couche mince des métabolites a permis de montrer que seule la moitié de l'azote était consommée, ce qui peut laisser penser que le cycle n'a pas été cassé durant cette expérience.

b) Biodégradation en condition anoxique ou anaérobie de l'hexogène et de l'octogène.

Plusieurs études ont montré que l'hexogène pouvait être dégradé sous conditions anaérobies⁵ ou anoxiques⁶. Mc Cormick *et al* (1981) ont étudié la dégradation de l'hexogène en aérobiose et en anaérobiose en présence de boues de STEP (station d'épuration) et ont proposé une voie de dégradation de l'hexogène. Alors que des boues aérées n'ont révélé aucune dégradation significative, une réduction significative des concentrations en hexogène (100mg/l en 4 jours) a été mise en évidence dans les expériences conduites en conditions anaérobies. Certaines de ces expériences ont été menées avec du [¹⁴C]-hexogène. Plusieurs métabolites ont été identifiés dans ces conditions, l'hexahydro-1-nitroso-3,5-dinitro-1,3,5-triazine (MNX), l'hexahydro-1,3-dinitroso-5-nitro-1,3,5-triazine (DNX), l'hexahydro-1,3,5-trinitroso-1,3,5-triazine (TNX), l'hydrazine, le 1,1-diméthylhydrazine, le 1,2-diméthylhydrazine, le formaldéhyde, et le méthanol.

Des essais de bioremédiation ont été réalisés sur des sols contaminés par de l'hexogène en faisant varier le potentiel redox (Eh) (Light *et al.*, 1997). Ces expériences ont utilisé les conditions suivantes : aérobie, nitrate-réductrice, sulfate-réductrice. Ces conditions, en réalité se réfèrent à un Eh donné par les courbes publiées par Rowell (Figure 9), ce qui donne des conditions de Eh inférieures à 0,2V pour dégrader l'hexogène. L'hexogène n'est pas dégradé en aérobiose. Cependant, une dégradation significative de l'hexogène a pu être observée en conditions réduisant les nitrates et les sulfates, à condition que l'hexogène soit le seul composé à dégrader.

⁵ Conditions anaérobies : des conditions anaérobies désignent un milieu privé d'oxygène.

⁶ Conditions anoxique : des conditions anoxiques désignent un milieu pauvre en oxygène.

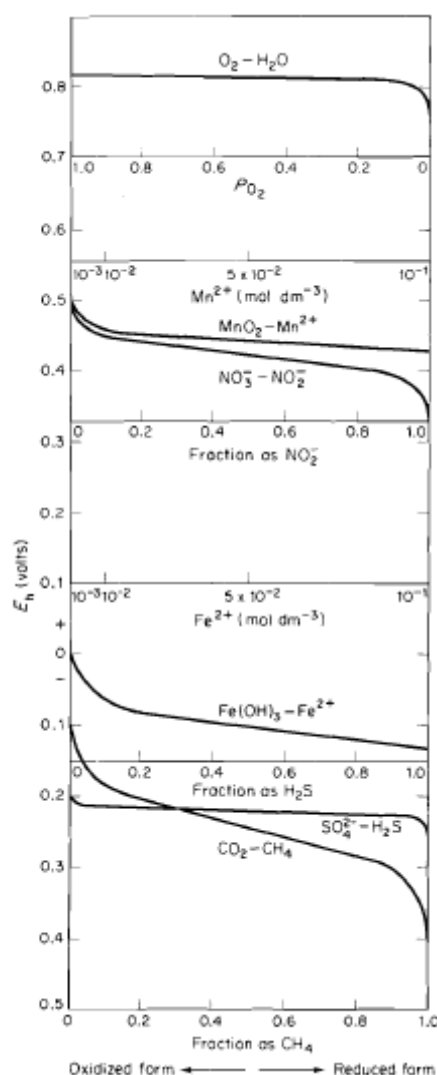


Figure 9 : Relation entre le potentiel redox et la composition de couples redox importants dans les sols (Rowell, 1981).

En 1993, Funk *et al* ont étudié la bioremédiation de l'hexogène et de l'octogène dans des conditions anaérobies strictes. Sur un sol contaminé par des teneurs de l'ordre de 30 mg/L en hexogène, une incubation de 24 jours était nécessaire pour que la concentration en hexogène passe en dessous des seuils de détection. Aucun métabolite n'a été identifié dans ces conditions.

Kitts *et al.* (1994) ont montré qu'une bactérie (*Morganella morganii*) issue d'un sol contaminé est capable de cométaboliser l'hexogène et l'octogène. Ce co-métabolisme⁷ requiert un environnement très légèrement aérobie, la dégradation se faisant par réduction des

⁷ Co-métabolisme : transformation d'un substrat ne servant pas à la division cellulaire en présence obligatoire d'un substrat de croissance ou d'un autre composé assimilable.

dérivés nitroso. Cette étude a également montré que l'apport de nitrates ou de nitrites diminuait le rendement de dégradation. Dans une autre étude également réalisée en 1994, Kitts *et al* ont isolé trois lignées d'Enterobacteries (*Providencia rettgeri* B1, *Morganella morganii* B2, et *Citrobacter freundii* NS2) capables de dégrader l'hexogène en cultures pures.

Les études de dégradation anaérobie de l'hexogène et de l'octogène sont tributaires de la présence de donneurs et d'accepteurs d'électrons capables de les transformer (Beller et Tiemer, 2002). Un exemple d'oxydo-réduction aboutissant à la métabolisation de l'hexogène est donné dans la Figure 10.

Plusieurs technologies basées sur des processus biologiques ont été développées pour la dépollution de sols contaminés par les explosifs, les principales étant l'utilisation de bio-réacteurs avec de la boue, le compostage et le "land farming" (Esteve-Núñez *et al.*, 2001 ; Snellinx *et al.*, 2002).

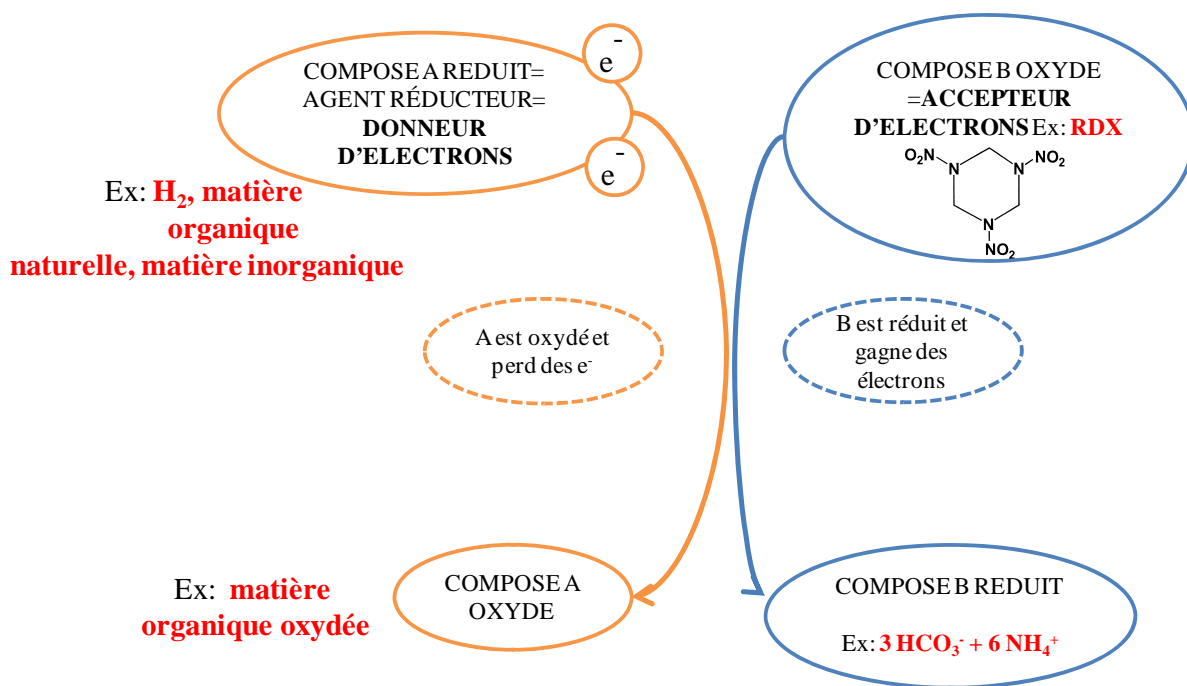


Figure 10 : Equation montrant l'implication des donneurs d'électrons durant la dégradation des explosifs en anaérobie.

L'ajout de dihydrogène (H₂) ou de donneurs d'électrons donnant du H₂ stimule la biotransformation de l'hexogène, et de l'octogène (Adrian *et al.*, 2003). Comme le montre le Tableau 7, différents donneurs d'électrons peuvent être utilisés dans l'objectif de dégrader les explosifs.

Tableau 7 : Influence de donneurs d'électrons sur la dépollution d'explosifs

Donneur d'électron	dépollution des explosifs en %	
	hexogène	octogène
Ethanol	100	53
Hydrogène	100	40
Propylèneglycol	100	22
Butyrate	0	0
Sans donneur d'électrons	0	0

Si la dégradation des nitramines a été largement étudiée, les études de dégradation sur les autres composés nitrés sont plus rares.

B. Les composés nitro-aromatiques

Les recherches effectuées au cours des 20 dernières années ont révélé de nombreux microorganismes capables de dégrader les composés nitro-aromatiques par des voies aérobie et anaérobie (Spain, 1995 ; Esteve-Nunez *et al.*, 2001).

En condition aérobie, les bactéries transforment le TNT en réduisant un ou deux groupements nitrés (Esteve-Núñez *et al.*, 2001). Les bactéries aérobies sont capables de réduire deux des trois groupes NO₂, la réduction du troisième groupe nécessitant des conditions anaérobies. Ainsi, certaines souches sont capables d'utiliser le TNT comme unique source d'azote (Vila, 2006). Le clivage du noyau aromatique du TNT ne semble toutefois pas possible chez les bactéries sauf exceptionnellement et avec une faible efficacité comme, par exemple, chez les espèces *Pseudomonas* (Oh *et al.*, 2003) et *Enterobacter*.

En condition anaérobie, la souche la plus étudiée est *Clostridium* (Esteve-Núñez *et al.*, 2001). Ces bactéries réduisent rapidement le TNT car il n'y a pas de polymérisation (formation d'azoxy) en absence d'oxygène.

Kulkarni et Chaudari (2006) ont montré que *Pseudomonas putida* est capable de dégrader le p-nitrophénol jusqu'à une concentration de 300mg/L. De plus, plusieurs espèces de *Streptomyces* isolées sur des sols agricoles ont montré un potentiel de dégradation du diuron, dérivé des phénylurées (Castillo *et al.*, 2006).

La dégradation du Dinoseb n'a pas été observée dans des conditions aérobies (Monnig et Zweidinger, 1980). En revanche, dans des conditions de microaération, les microorganismes sont capables de transformer le Dinoseb (Froslie et Karlog, 1970 ; Tiedje *et al.*, 1984). Des

études ont également montré que dans des conditions anaérobies en milieu liquide ou en sol, le Dinoseb peut être dégradé (Kaake *et al.*, 1992).

Si de nombreuses études ont été réalisées sur la bioremédiation des pesticides, peu évoquent la dégradation spécifique du Dinoseb et du Dinoterb.

PARTIE II

Etude expérimentale

Chapitre 1.

Caractéristiques physico-chimiques du sédiment

L'étude a été réalisée sur une lagune de décantation dans l'enceinte d'une usine de production de composés nitrés de type nitrophénols et nitramines comprenant des explosifs et des herbicides. L'évolution des procédés de production a permis d'arrêter le rejet d'effluents dans cette lagune depuis plusieurs années. Toutefois, comme le montre la Figure 11, les déchets se sont déposés et persistent dans cette lagune, des cristaux purs de composés nitrés peuvent être observés à certains endroits, révélateurs d'un niveau de pollution élevé. De plus, une partie de la lagune (les deux tiers environ) ont été comblés avec des graviers et des galets, enterrant ainsi les sédiments contaminés. Des objets tels que des bidons et des gravats peuvent être trouvés sur les berges et dans la lagune.

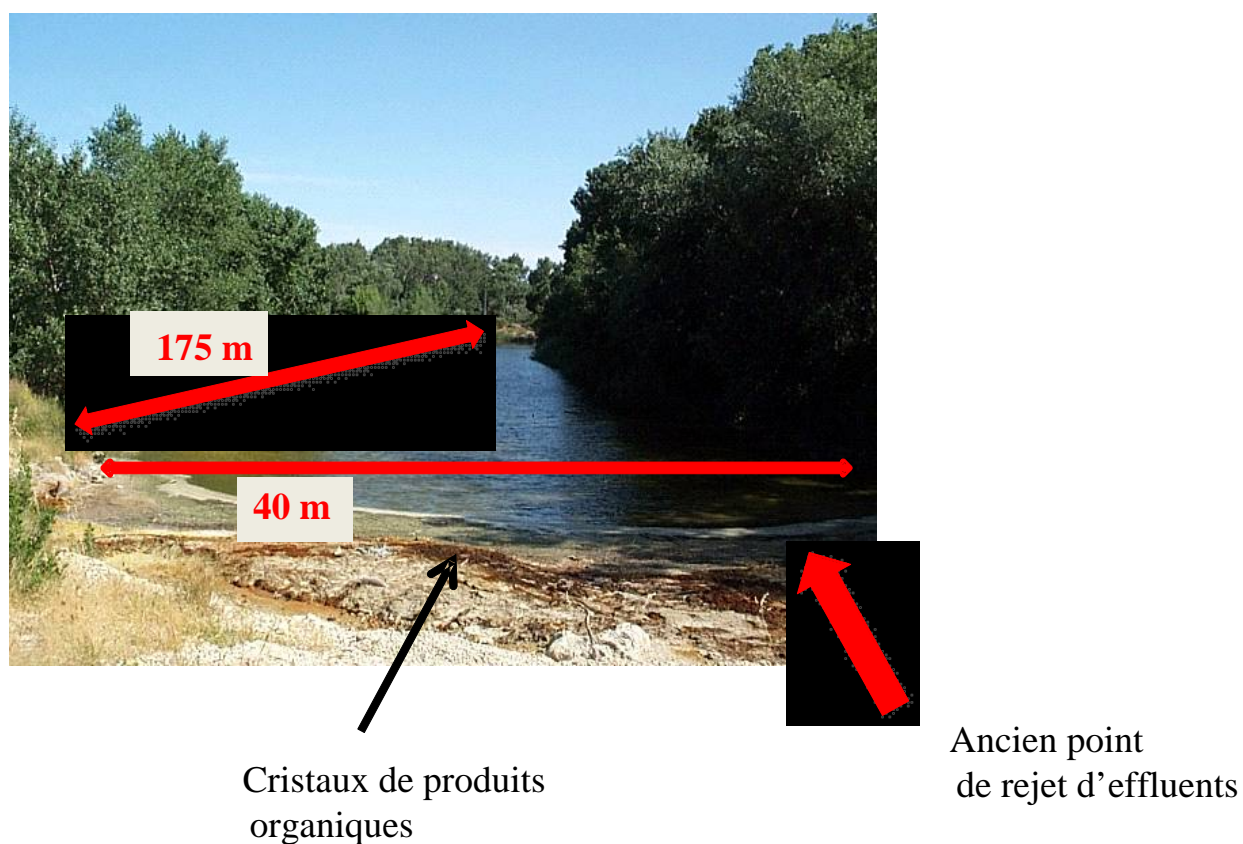


Figure 11 : Photographie de la lagune étudiée

La lagune mesure 40m de large sur 175m de long pour une surface de 7000 m². Elle a été subdivisée en 14 carrés de 20 x 25m définissant ainsi des zones de 500 m² comme le montre la Figure 12.

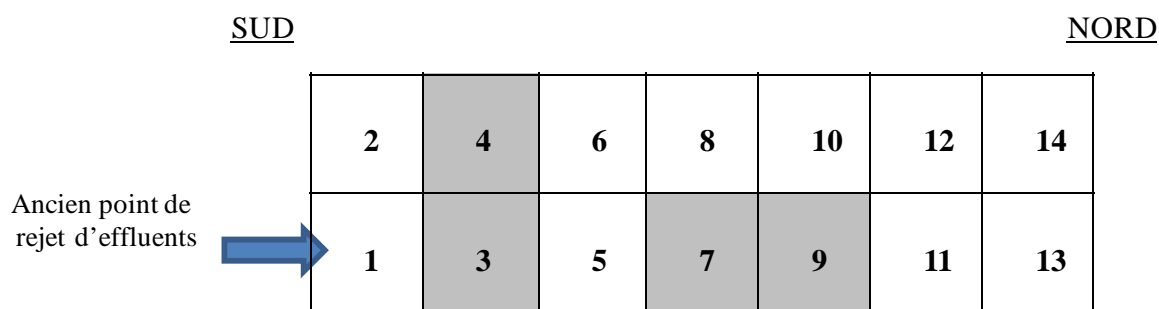


Figure 12 : Maillage de la lagune (chaque zone possède une surface d'environ 500 m²)

Des analyses ont été réalisées sur la boue à la demande de l'entreprise en 2003 par un bureau d'étude de diagnostics environnementaux. Les concentrations en composés nitrés les plus représentatifs de la lagune mesurées dans les 40 premiers cm de sédiment sont données dans le Tableau 8. Comme nous pouvons le constater, de fortes teneurs en composés nitrés sont présentes allant jusqu'à 8,8g de TNT par kg de sédiment et 5,5 g d'hexogène par kg de sédiment. Les dinitrophénols sont également présents en quantités importantes, notamment dans la zone 4 où nous pouvons trouver 48g de Dinoterb et 16g de Dinoseb par kg de sédiment. Ces fortes teneurs en nitramines et nitrophénols sont accompagnées de multiples autres composés nitrés, produits de réaction, intermédiaires, qui occupent le sédiment.

Tableau 8 : Concentrations en octogène, hexogène, TNT, Dinoseb, et Dinoterb en surface de chaque zone (0-40cm).

	Octogène (mg/kg)	Hexogène (mg/kg)	TNT (mg/kg)	Dinoseb (mg/kg)	Dinoterb (mg/kg)
Zone 3	53	2186	8848	564	2116
Zone 4	85	5550	5416	16172	48112
Zone 7	80,6	23,6	n.d	5,5	25,5
Zone 9	206	17,1	n.d	1,9	0,7

I. Dispositif de prélèvement

En vue des analyses de sédiments, des prélèvements ont été réalisés à partir d'un zodiac pneumatique par du personnel entièrement protégé : lunettes, masques, combinaisons. Ces prélèvements ont été effectués à l'aide d'un carottier rectangulaire enfoncé manuellement

dans le sédiment, soit jusqu'à ce qu'il ne pénètre plus, soit jusqu'à ce que le sommet atteigne la surface de l'eau. Les échantillons ont été prélevés dans des zones à fortes concentrations en explosifs et pesticides (secteurs 3 et 4) et d'autres à plus faibles concentrations (7 et 9). Les concentrations en composés chimiques ont été estimées lors d'analyses antérieures. Les zones de prélèvement se trouvent dans les carrés grisés du maillage indiqué Figure 12.

Chaque zone a été prélevée par un carottage au centre du polygone et subdivisée en couches selon l'aspect macroscopique des sédiments. La description a été réalisée suivant une méthode d'observation visuelle voisine du procédé de description des sols, (suivant les fiches STIPA, 2000). Le récapitulatif du dispositif d'échantillonnage est présenté sur la Figure 13 :

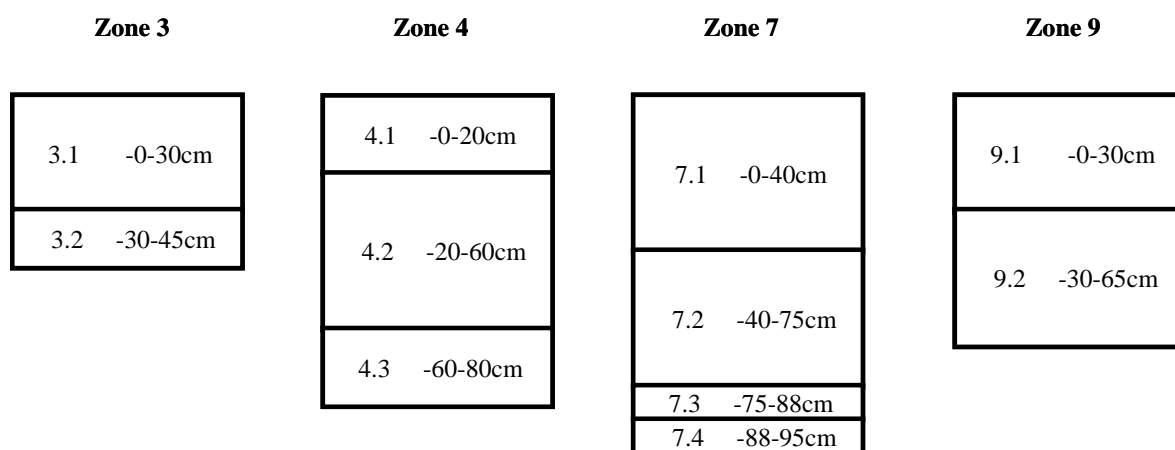


Figure 13 : Subdivisions en couches visuellement homogènes de chaque point de prélèvement.

Chaque couche a ainsi été échantillonnée, stockée à 4°C, et soumise aux descriptions et analyses physico-chimiques décrites ci-dessous.

Dans l'objectif de déterminer les améliorations à apporter en vue d'appliquer un procédé de bioremédiation, il a été nécessaire de connaître les caractéristiques physico-chimiques des sédiments présents sur le site d'étude. En effet, ces facteurs jouent un rôle primordial sur la biodisponibilité et par conséquent sur l'élimination potentielle des composés organiques. Dans cette optique, afin de pouvoir caractériser avec précision la composition élémentaire de ces sédiments en composés chimiques, le pourcentage de matière sèche a été analysé. De plus, des analyses du pH, du carbone organique total, de l'azote total et des éléments alcalins et alcalino-terreux hydrosolubles disponibles ont été réalisées.

II. Description macroscopique des sédiments

A. Au sommet de tous les sédiments

- De 1 à 0,5cm, sédiment grisâtre limoneux.
- 0,5 à 0 cm, sédiment noir organique, avec de nombreux débris plus ou moins humifiés de végétaux (feuilles, tiges). Ces deux couches, trop minces ne seront pas étudiées, nous travaillerons sur les couches plus profondes décrites par la suite.



Figure 14 : Carottage des sédiments de la lagune.

La couleur des prélèvements a été déterminée selon le code Munsell. Le code Munsell est un référentiel international des couleurs, dont une charte pour les sols existe. Les teintes de base correspondent aux couleurs principales, le rouge (R, red), le jaune (Y, yellow), le vert (G, green), le bleu (B, blue) et le pourpre (P, purple). Chaque faisceau de couleur est découpé en 10 segments : 10R est le plus rouge, 2.5Y le moins jaune. La clarté est donnée selon 7 valeurs 2.5, 3, 4, 5, 6, 7 et 8, la saturation selon 6 valeurs, 1, 2, 3, 4, 6 et 8.

B. Prélèvement zone 3

- De 0 à 30cm : boue huileuse de couleur 2.5Y 3/2 contenant 1 à 2% de débris végétaux, plus nombreux au sommet.
- De 30 à 45 cm : argile de couleur 10 Y 6/5 avec taches irrégulières de boue huileuse de couleur 2.5Y 4/3. Le carottier ne pénètre plus dans le sédiment à partir de 45 cm.

C. Prélèvement zone 4

- De 0 à 20 cm : cette couche est composée d'une boue huileuse de couleur 2.5Y 4/4 suivant le code Munsell.
- De 20 à 60 cm : boue huileuse de couleur 2.5Y 4/3.
- De 60 à 80 cm : mélange de sédiments organiques et huileux de couleur 2.5YR 5/4 et minéral de couleur 10YR 7/8. Le carottier ne pénètre plus dans le sédiment à partir de 80 cm.

D. Prélèvement zone 7

- De 0 à 40 cm : aspect assez pâteux, grumeleux de couleur 10 YR- 4/3. Echantillon relativement homogène avec quelques rares débris de feuilles ou de tiges.
- De 40 à 75 cm : pâte homogène avec quelques grumeaux de couleur 10 YR 4/5 assez homogène. Aspect huileux avec présence de cailloux.
- De 75 à 88 : une fraction liquide de couleur 10YR3/2 et une fraction de couleur 10YR 5/4 composée de quelques débris végétaux et des parties pâteuses moins liquides.
- De 88 à 95cm : échantillon minéral de couleur 10YR-6/8. Présence de débris végétaux. Le carottier ne pénètre plus dans le sédiment à partir de 95 cm.

E. Prélèvement zone 9

- De 0 à 30cm : sédiment de surface très liquide et huileux de couleur 10YR 3/3 4/3. Présence de quelques feuilles, ainsi que d'yeux de lipides. Echantillon très liquide avec de gros grumeaux plus pâteux.
- De 30 à 65cm : d'odeur putride, échantillon d'aspect relativement liquide assez homogène, sans débris de feuilles, de couleur 10YR 4/4. Le carottier ne pénètre plus dans le sédiment à partir de 65 cm.

Conclusion : les 4 prélèvements montrent que :

- Le sommet des sédiments a une profondeur très variable (Zones 3 et 9 plus profonds)
- Sous le sédiment existe une couche argileuse plus ou moins contaminée à des profondeurs variables.
- Le sédiment est composé :
 - ✓ D'une mince couche de matériaux apportés par les arbres voisins et les poussières atmosphériques,
 - ✓ D'une boue huileuse organique avec parfois des mélanges d'argiles plus abondantes en profondeur (zone 7), plus liquide en surface qu'en profondeur.

III. Descriptif des analyses physico-chimiques

A. Analyse de la matière sèche

La matière sèche est évaluée en mesurant l'évolution de la masse d'échantillon prélevé humide après passage à l'étuve à 60°C. Pour cela, 2g de sédiment humide sont prélevés et placés dans des boîtes de Pétri puis pesés au centième de gramme. Les boîtes sont ensuite placées à l'étuve à 60°C pour une durée de 3 jours et pesées à nouveau. La différence de masse observée permet de calculer le pourcentage de matière sèche des échantillons.

B. Mesure du pH

Le pH a été mesuré conformément à la procédure recommandée par la norme française AFNOR NF ISO-10390. Le pH des sédiments est mesuré après dilution dans l'eau pure ou après dilution dans une solution de chlorure de potassium KCl 1N. Pour l'analyse du pH, cinq grammes de chaque échantillon de sédiment sec sont prélevés et dilués dans 20mL d'eau ou 20ml de KCl 1N. L'équilibre ionique atteint entre la phase solide et la phase liquide, la mesure du pH est effectuée par différence de potentiel existant entre une électrode de mesure et une électrode de référence plongée dans la solution aqueuse de la suspension en équilibre avec l'échantillon.

C. Analyse des éléments alcalins et alcalino terreux hydrosolubles

Les échantillons secs à analyser sont pesés à hauteur d'un gramme et ajoutés à 20mL d'eau chaude (80°C). Les surnageants sont prélevés dans les piluliers et déposés dans des tubes de 50 ml qui seront centrifugés 10mn à 1000g. Le surnageant est de nouveau prélevé et filtré sur cartouche (Li Chlorut EN. MERCK) afin de séparer la phase hydrosoluble de la phase organique. Le principe de l'extraction est présenté sur la Figure 15. Par cette méthode, les composés organiques sont fixés sur la cartouche, séparant la phase hydrosoluble de la phase organique.

Percolation de l'échantillon

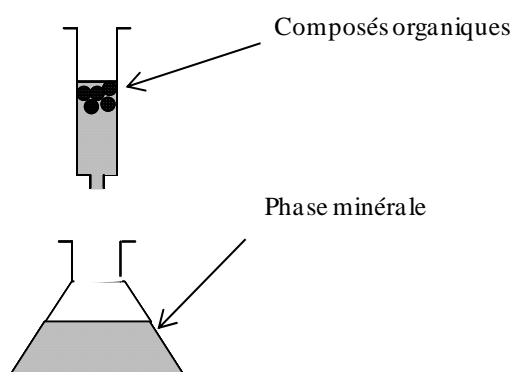


Figure 15 : Principe de l'extraction des composés hydrosolubles sur cartouche

Les anions présents dans la phase minérale de l'échantillon (Cl^- , NO_2^- , NO_3^- , H_2PO_4^- , SO_4^{2-}) et les cations (Na^+ , NH_4^+ , K^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+}) sont dosés par chromatographie liquide ionique de type DIONEX DX 100 grâce à une colonne ASRS Ultra 4mm P/N 53946 pour les anions et P/N 53948 pour les cations (Cf Figure 16). La concentration de chaque ion est déterminée grâce à des standards.



Figure 16 : Chromatographe ionique Dionex DX 100.

D. Dosage des carbonates (CO_3^{2-})

Afin de compléter l'étude concernant l'origine du carbone, nous avons procédé au dosage des carbonates CO_3^{2-} . Pour cela, un calcimètre de Bernard a été utilisé comme le montre la photographie du montage (Figure 17).

Ce calcimètre consiste à mesurer le volume de CO_2 dégagé par l'action de l'acide chlorhydrique (HCl) sur le carbonate de calcium (CaCO_3) contenu dans 1g de sédiment sec.

L'acide étant en excès, son action sur une mole de CaCO_3 (100g.mol^{-1}) libère une mole de CO_2 (22,4L soit 22400mL), l'équation de la réaction s'écrit :



Connaissant la masse de CaCO_3 et la masse de l'échantillon, on peut déterminer le pourcentage de CaCO_3 dans l'échantillon.

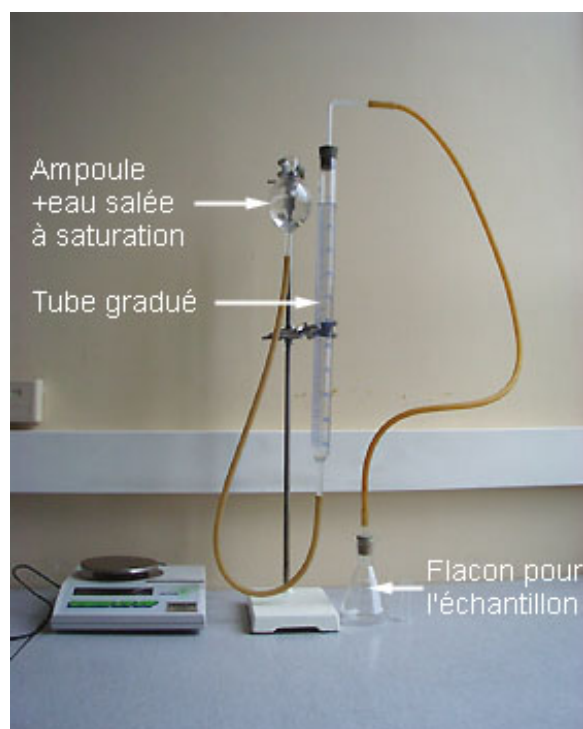
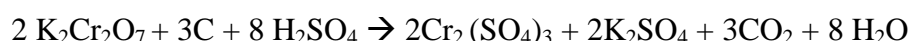


Figure 17: Montage d'un calcimètre de Bernard permettant le dosage des carbonates.

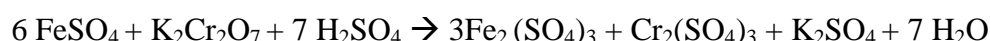
E. Dosage du carbone organique total (COT)

Le dosage du COT est basé sur l'oxydation du carbone organique C par le bichromate de potassium $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ selon le schéma réactionnel suivant :

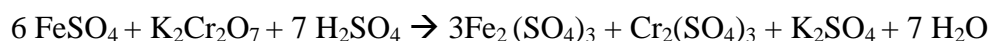
Oxydation du carbone C par le bichromate $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ en milieu sulfurique H_2SO_4 :



Réduction de l'excès de bichromate par le sulfate de fer FeSO_4 du sel de Mohr $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$:



Titration de l'excès de sel de Mohr par le bichromate de la burette :



Théoriquement, 1 mL de solution 1N de $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ oxyde 3mg de carbone organique. Si l'on considère que le taux d'oxydation n'est pas total, on ne pourra que prendre le taux de 77% correspondant au taux de la méthode Anne par rapport à la méthode Walkey and Black pour les sols. Vérification sera faite avec les résultats de la microanalyse. Dans les conditions opératoires utilisées, 1mL de $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ correspond donc à 3.9 mg de C organique.

F. Dosage de l'azote total : Méthode Kjeldahl

Le dosage de l'azote total est basé sur la minéralisation de type Kjeldahl utilisant un catalyseur au Sélénium. Deux cent mg de sédiment sec sont mis à digérer dans 10mL d'acide sulfurique H_2SO_4 pur pendant 12h. Cette étape est suivie d'une minéralisation à $370^{\circ}C$ pendant 2h (en présence de Na_2SO_4) et d'une distillation au cours de laquelle l'ammoniac NH_3 libéré est titré par une solution d'acide sulfurique H_2SO_4 à 0.1N.

G. Microanalyse : dosage du carbone, azote, soufre, et hydrogène

L'ensemble des analyses a été réalisé à l'Ecole Nationale Supérieure des Ingénieurs en Arts Chimiques et Technologiques (ENSIACET) à l'aide d'un microanalyseur de marque CARLO ERBA 1106. La technique est basée sur la méthode de Dumas et Pregl. La prise d'essai, d'une masse comprise entre 0,4 et 1,3 mg, est placée dans une capsule en étain. L'ensemble est introduit dans un réacteur en quartz maintenu à $1030^{\circ}C$ pour être pyrolysé. Les gaz de pyrolyse sont entraînés par un courant d'Hélium He (gaz neutre) et passent sur un catalyseur (Cr_2O_3) qui les oxyde en CO_2 , H_2O et $NxOy$. Ces derniers sont séparés par chromatographie et décelés par un détecteur à conductibilité thermique. La teneur en C, H, N est calculée par rapport à un étalon externe. L'incertitude relative de la méthode est de 0,3 % pour C, 0,1 % pour H, et 0,2 % pour N de la valeur nominative. Le soufre est détecté de la même façon à partir des gaz de pyrolyse.

H. Dosage de l'oxygène (O_2)

Comme précédemment, l'échantillon est pyrolysé. Les gaz de pyrolyse entraînés par un courant d'He passent sur du charbon activé recouvert de nickel servant de catalyseur. L'oxygène O_2 est alors transformé en oxyde de carbone CO qui est séparé par chromatographie. On utilise la même méthode de calcul que pour C, H, N. L'incertitude de la mesure est de 0,3 %. Dans le cas d'échantillons fortement minéralisés, la teneur en O_2 observée peut prendre en compte de l' O_2 libéré lors de la pyrolyse par des oxydes de Fe, d'Al et des silicates.

IV. Résultats

A. Analyse de la matière sèche

Les pourcentages de matière sèche des différents échantillons sont présentés sur la Figure 18. Nous pouvons remarquer que les zones 3 et 4 sont assez peu hydratées. Ces zones sont asséchées en été, l'hydratation du sédiment doit être moins facile que dans les zones ennoyées toute l'année. Ainsi, le pourcentage de matière sèche avoisine 45% dans ces deux zones.

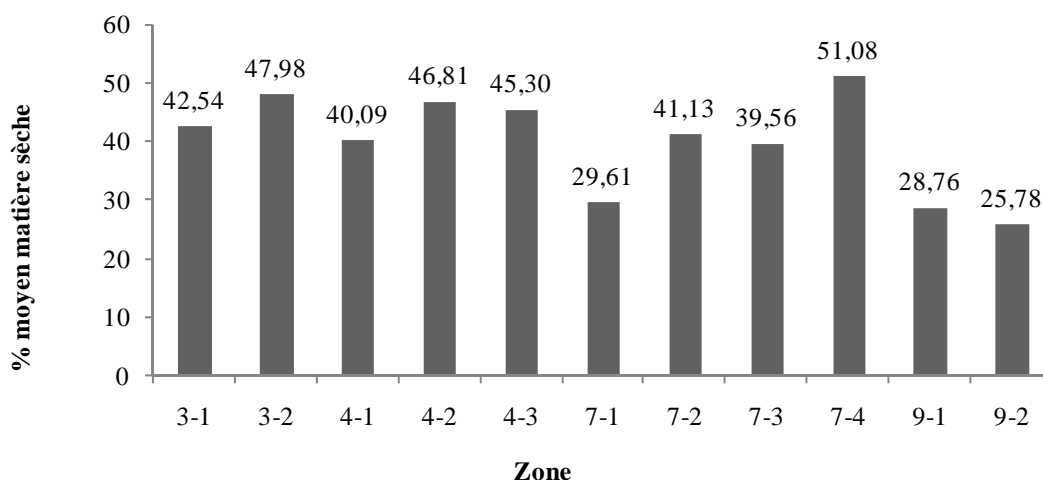


Figure 18 : Pourcentage de matière sèche des échantillons prélevés dans la lagune.

Lorsque la présence d'argiles est observée dans le sédiment, nous pouvons observer une augmentation du pourcentage de matière sèche (cas du 3.2, 4.3 et 7.4). De même, quand la hauteur d'eau surplombant le sédiment est élevée, il n'y a pas de déshydratation estivale, ceci associé à l'absence d'argiles engendre des pourcentages de matière sèche d'environ 25% (zones 9.1 et 9.2).

B. Mesure du pH

Le pH a un impact déterminant sur la disponibilité des produits organiques. De plus c'est un facteur abiotique⁸ important dont dépendent les organismes vivants dans la lagune. Par conséquent, il a été mesuré au niveau des différentes zones de la lagune. La Figure 19 présente les pH à l'eau mesurés dans les différents prélèvements. Pour le secteur 3, un pH de

⁸ Facteur abiotique : Facteur physique et/ou chimique dont la valeur est indépendante des processus vitaux.

6,75 a été mesuré en surface ; celui-ci diminue de 3 unités à 30cm de profondeur. De même pour la zone 4 au niveau de laquelle le pH passe de 6,55 à 3,09 à 20cm de profondeur. Le pH est stable dans la zone 7, quelle que soit la profondeur. Le pH de la zone 9 perd également 3 unités en passant de 0 à 30 cm de profondeur, comme les secteurs 3 et 4.

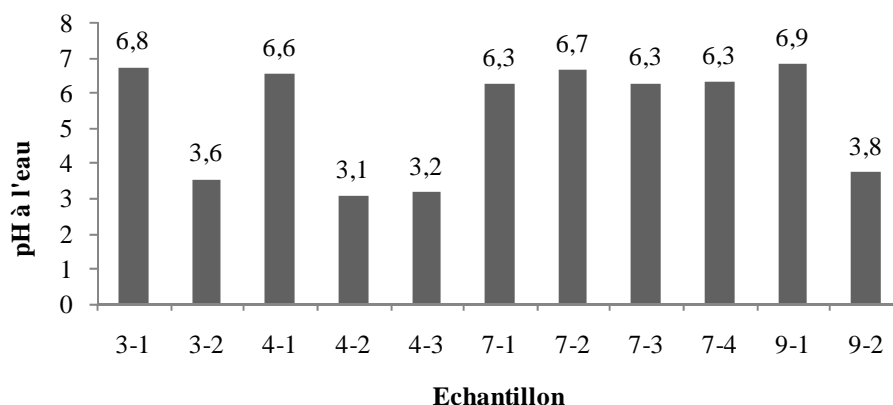


Figure 19 : pH à l'eau mesuré dans les échantillons prélevés dans la lagune.

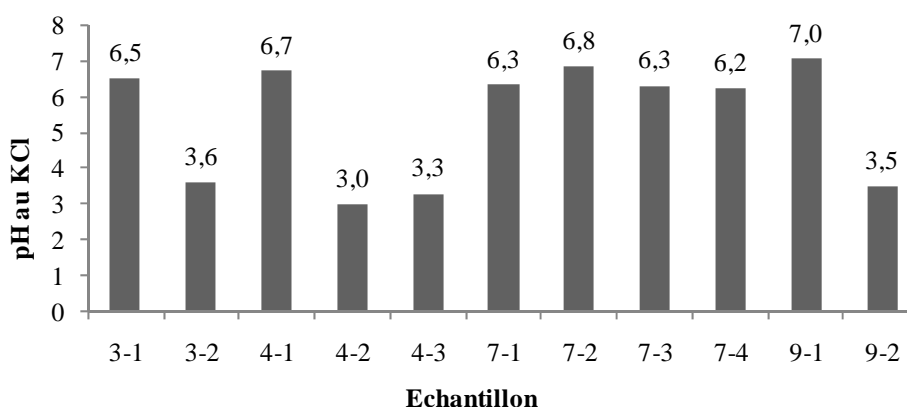


Figure 20 : pH au KCl mesuré dans les échantillons prélevés dans la lagune.

La Figure 20 présente les pH au KCl mesurés lors des différents prélèvements. Aucune différence significative n'est observée entre le pH à l'eau et le pH au KCl ce qui indique une absence d'acidité d'échange.

Nous pouvons remarquer deux groupes de pH : entre 6 et 7 en surface et sur l'ensemble du profil de la zone 7 et aux environs de 3 en profondeur et dans les fonds argileux du bassin.

Les pH très acides sont compatibles avec les pH des produits fabriqués. On note que les roches argileuses présentent le même pH. Une diffusion résultant de l'influence des contaminants sur le matériau géologique encaissant pourrait avoir lieu. Ceci est un indice de risques de fuites.

Les pH compris entre 6 et 7 peuvent être expliqués de diverses manières :

- Rejet d'un effluent neutralisé au niveau de l'usine en fin d'utilisation de la lagune. Le lieu de rejet aurait été dans la zone 7.
- Neutralisation par les poussières atmosphériques plus ou moins calcaires, par l'eau de la nappe qui fluctue et amène (après dessiccation), une solution à pH 8,3 par les carbonates contenus, par apport anthropique dans la lagune d'un produit neutralisant (Gravats de béton, graviers calcaires) en plus grande quantité dans la zone 7 qui contient d'ailleurs beaucoup plus d'éléments détritiques n'appartenant pas à la production.

C. Analyse des éléments alcalins et alcalino terreux hydrosolubles

L'analyse des cations présentée dans le Tableau 9 montre une forte concentration en calcium répartie de façon hétérogène. Aucun autre cation n'est présent en quantité significative. De plus nous pouvons constater qu'il n'existe pas de relation directe entre le pH et la teneur en calcium. Cette distribution hétérogène pourrait représenter des rejets de l'usine.

Tableau 9 : Pourcentage de cations présents dans les échantillons prélevés dans la lagune.

Echantillons	Cations (en mmol.L⁻¹)				
	Na⁺	NH₄⁺	K⁺	Mg²⁺	Ca²⁺
3-1	0,5	0,0	0,0	0,5	71,9
3-2	0,9	0,1	0,0	0,8	72,3
4-1	1,1	0,0	0,0	0,4	3,5
4-2	1,0	0,0	0,0	0,8	108,2
4-3	1,1	0,0	0,0	0,7	344,9
7-1	1,7	0,0	0,1	1,2	6,2
7-2	0,6	0,0	0,0	0,5	74,7
7-3	1,0	0,0	0,0	0,9	132,0
7-4	0,6	0,0	0,0	0,5	75,6
9-1	1,5	0,0	0,2	1,2	69,9
9-2	1,1	0,0	0,1	0,2	36,0

Globalement, une faible concentration en éléments alcalins et alcalino-terreux hydrosolubles est observée. Par contre, une forte teneur en calcium est constatée, son origine peut être multiple. Après enquête, aucune opération de chaulage n'a été effectuée. Cette forte teneur en Ca pourrait être liée à la corrosion des canalisations en béton, ainsi qu'aux eaux de ruissellement provenant des sols très calcaires entourant la lagune.

Dans le Tableau 10, nous pouvons noter la présence de chlore et de sulfates mais la concentration de ces éléments reste faible et hétérogène. De plus, les concentrations en phosphates et nitrates sont très faibles.

La somme des cations dosés est bien supérieure à la somme des anions pour une même couche. Il est donc probable que le complément de charge soit assuré par des acides organiques indéterminés.

Tableau 10 : Pourcentage d'anions présents dans les échantillons prélevés dans la lagune.

Echantillons	Anions (en mmol.L⁻¹)				
	Cl⁻	NO₂⁻	NO₃⁻	HPO₄²⁻	SO₄²⁻
3-1	1,3	0,1	0,1	0,0	0,1
3-2	2,2	0,0	0,1	0,0	0,8
4-1	1,7	0,2	0,1	0,0	0,1
4-2	2,5	0,0	0,1	0,1	1,0
4-3	2,3	0,0	0,1	0,0	3,2
7-1	1,6	0,0	0,1	0,2	0,5
7-2	1,3	0,0	0,1	0,0	0,4
7-3	1,9	0,0	0,1	0,1	1,2
7-4	1,4	0,0	0,1	0,0	0,4
9-1	3,9	0,0	0,7	0,1	0,4
9-2	1,7	0,0	0,1	0,0	0,4

D. Dosage des carbonates

Comme le montre la Figure 21, les zones 3 et 4, représentant les zones les plus polluées en produits organiques (jusqu'à 33% de carbone dans la zone 3.1) sont dépourvues de

carbonates. En revanche, nous pouvons remarquer que la surface des zones 7 et 9 contient de faibles quantités de carbonates. En effet les zones 7.2 et 9.1 contiennent respectivement 11% et 4,1% de carbonates.

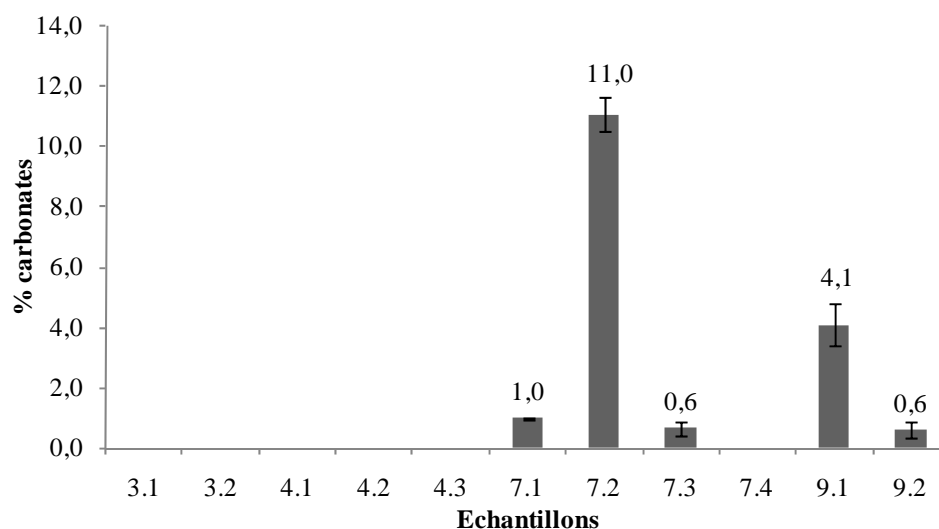


Figure 21 : Pourcentage de carbonates sous forme CaCO_3 présents dans le sédiment.

E. Dosage du COT

Le COT a été mesuré par deux techniques différentes. Le COT mesuré par la technique CHNOS donne des résultats proches de ceux obtenus par la méthode au bichromate de potassium. Le dosage du carbone par CHNOS mesure également la fraction de carbone apportée par les carbonates. Afin de rendre compte de la part de carbone uniquement d'origine organique, il est nécessaire de soustraire le carbone des carbonates à la valeur de carbone CHNOS (Tableau 11).

Tableau 11 : Pourcentage de carbone dû aux carbonates et carbone organique total corrigé.

Zone	3.1	3.2	4.1	4.2	4.3	7.1	7.2	7.3	7.4	9.1	9.2
% carbone dû aux carbonates	0	0	0	0	0	0,12	1,32	0,08	0	0,49	0,07
% carbone CHNOS	32,2	12,7	25,0	17,7	1,3	17,7	11,4	10,1	0,8	18,5	18,5
% carbone organique corrigé	32,2	12,7	25,0	17,7	1,3	17,6	10,1	10,1	0,8	18,0	18,4

La Figure 22 montre les différents pourcentages de COT corrigés observés dans les échantillons prélevés dans la lagune.

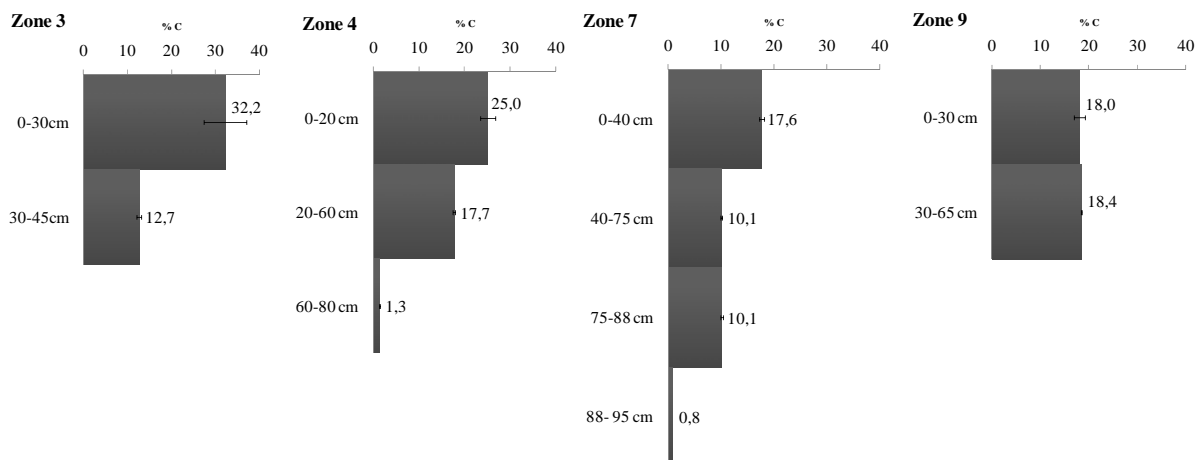


Figure 22 : Pourcentages de COT observés dans les échantillons de la lagune (n=3)

La distribution du COT des sédiments montre un profil qui généralement diminue avec la profondeur. La diminution de COT peut être corrélée avec l'augmentation des taches d'argile dans la couche. La diminution du COT est donc plus en relation avec la dilution de la matière minérale qu'avec la variation de la composition en produits organiques. L'échantillon 9, sans variation, présente aussi des caractères macroscopiques peu différents des caractères des couches supérieures des autres profils.

La Figure 23 met en évidence la part du carbone issu des carbonates parmi le carbone total. Le carbone apporté par les carbonates représente une partie non négligeable du carbone total pour deux échantillons. En effet, seuls les échantillons 7.2 et 9.1 présentent du carbone sous forme de carbonates à hauteur de 1,3% et 0,5% respectivement. Les carbonates ne peuvent donc expliquer qu'une partie de l'origine du carbone présent dans la lagune.

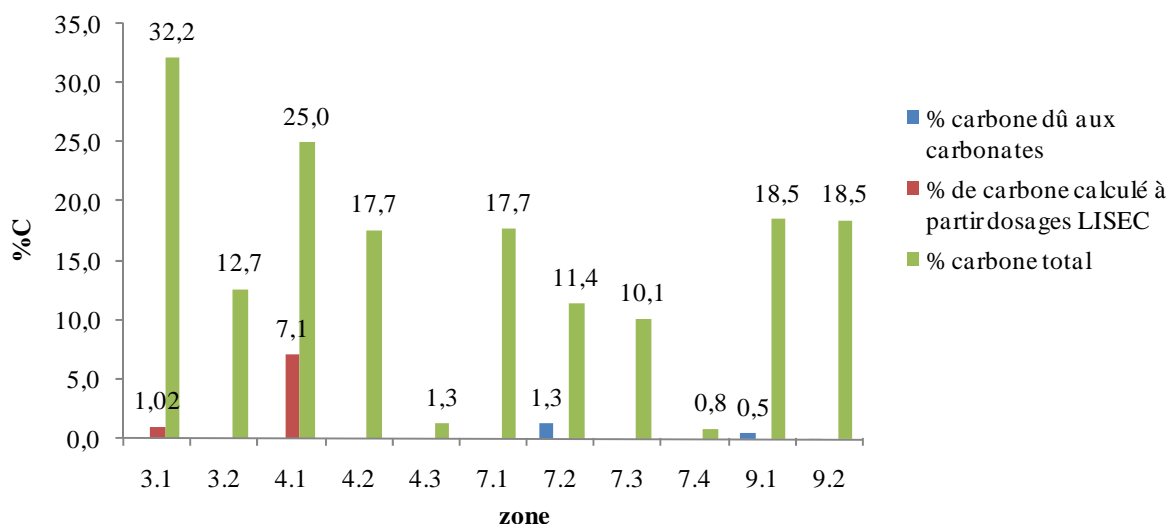


Figure 23 : Comparaison du carbone issu des carbonates avec le carbone organique total.

Ces résultats confirment l'hypothèse faisant état d'une quantité importante de carbone organique non dont la nature reste non identifiée.

A partir des concentrations fournies par le bureau d'étude sur le maillage et des formules des composés, il a été possible de calculer la part du carbone issu des composés connus. Pour réaliser ce calcul, pour chaque secteur de la lagune, les teneurs en composés organiques (exprimés en mg.kg^{-1} de sédiment humide) analysés par le bureau d'études sont prises en compte. Ces données sont finalement ramenées en mg.kg^{-1} de sol sec afin d'être comparées au % de carbone mesuré sur les échantillons. Cette comparaison réalisée avec les dosages effectués dans les échantillons de surface de chaque zone (3.1, 4.1, 7.1, 9.1) ne peut être qu'une estimation. En effet, les prélèvements n'ont pas eu lieu exactement au même endroit que ceux destinés aux analyses passées. Un exemple de calcul pour la zone 3 est détaillé en annexe II. Le comparatif est présenté sur le Tableau 12.

Au vu de ces estimations, deux sources supplémentaires de carbone peuvent être proposées :

- Carbone issu de la biomasse. Toutefois, les analyses effectuées précédemment ne montrent que de très faibles quantités de feuilles noircies non humifiées, les débris végétaux se montrant très rares.
- Carbone issu de composés chimiques non analysés par le bureau d'étude. Après enquête, il s'avère que d'autres composés peuvent être présents dans la lagune, en particulier des composés initiaux et les produits secondaires des réactions. De plus, d'autres composés

essentiellement organo-chlorés ou soufrés, précurseurs de pesticides et d'explosifs, peuvent également être présents dans la lagune.

Tableau 12 : Comparaison des données d'analyse avec le pourcentage de carbone mesuré dans les échantillons.

somme carbone apporté par Hexogène, Octogène, Dinoseb, et Dinoterb (analyses antérieures)	Analyses carbone organique labo	Différence en %
zone 3		
10,2g de carbone par kg de sol sec	322 g.kg ⁻¹	97%
zone 4		
71g de carbone par kg de sol sec	250 g.kg ⁻¹	71%
zone 7		
0,145g de carbone par kg de sol sec	177 g.kg ⁻¹	99,9%
zone 9		
0,168g de carbone par kg de sol sec	185 g.kg ⁻¹	99,9%

F. Dosage de l'azote total : Méthode Kjeldahl et CHONS

La Figure 24 représente les résultats du dosage d'azote par la méthode Kjeldahl et CHNOS. Conformément aux analyses fournies par le bureau d'études, une quantité d'azote importante (jusqu'à 12,5%) a été trouvée dans les zones « contaminées ». Pour chaque secteur, le pourcentage d'azote diminue avec la profondeur, de façon comparable au carbone total. De plus, le pourcentage d'azote diminue du sud vers le nord de la lagune allant de la zone la plus concentrée en composés organiques vers la moins concentrée.

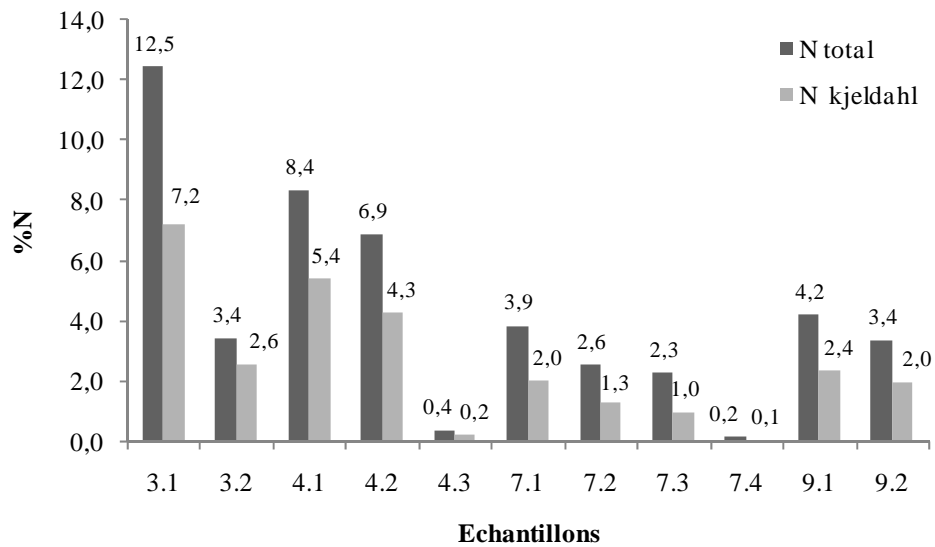


Figure 24 : Pourcentage d'azote mesuré dans les échantillons de la lagune.

Les deux méthodes de dosage de l'azote apportent une information complémentaire quant à la forme d'azote présente dans les sédiments. En effet, l'azote N dosé par la méthode Kjeldahl rend compte de l'azote des cycles tandis que la méthode CHNOS donne l'azote total. Par conséquent, la différence entre les deux méthodes nous donne la fraction d'azote apportée par le groupement nitro NO_2 (Figure 25).

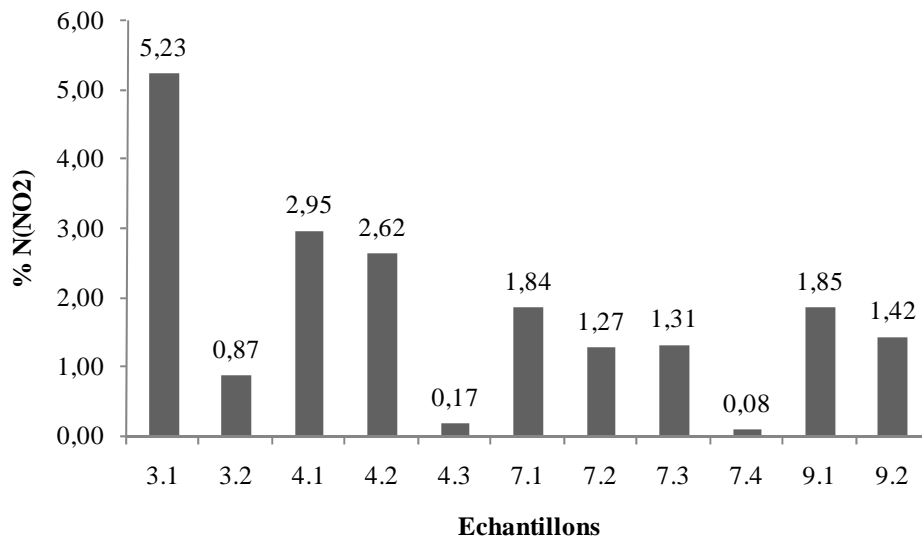


Figure 25 : Azote pouvant être attribué à la fraction apportée par NO_2 .

La Figure 26 montre le rapport N dosé par la méthode Kjeldahl/ N total. Nous pouvons constater que ce rapport varie de 0,43 à 0,75 ce qui marque une hétérogénéité dans la composition des sédiments.

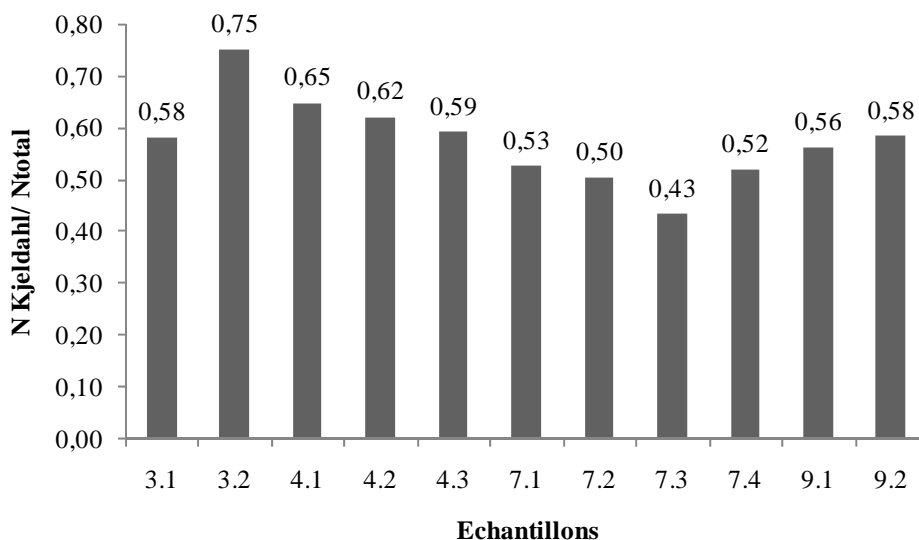


Figure 26 : Rapport N Kjeldahl / N total

D'une manière générale, les teneurs en azote suivent les teneurs en carbone. L'évolution du rapport C/N reflétant l'origine chimique ou biologique des molécules est présentée dans la Figure 27. Les variations du rapport C/N confirment l'hétérogénéité du sédiment mais on peut noter que le rapport C/N augmente en s'éloignant de la source des effluents.

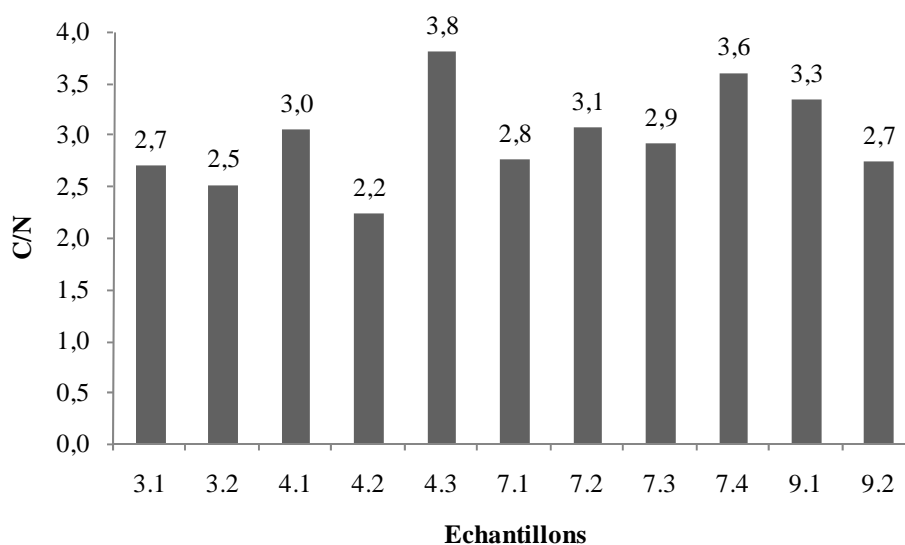


Figure 27 : Rapport C/N des échantillons prélevés dans la lagune.

G. Dosage du soufre, oxygène et hydrogène

Dans le Tableau 13 qui représente les analyses H, O et S, une quantité importante de soufre a été mesurée dans certains échantillons.

Tableau 13 : Analyse H, O et S des échantillons prélevés dans la lagune.

zone	3.1	3.2	4.1	4.2	4.3	7.1	7.2	7.3	7.4	9.1	9.2
% H	3,4	1,9	2,4	1,6	1,5	1,3	0,9	1,2	1,8	1,4	1,2
% O	26,4	17,6	18,7	17,5	14,3	9,8	15,5	14,4	15,3	12,7	11,6
% S	1,6	7,3	0,6	4,2	5,8	9,6	6,1	7,6	11,6	4,5	10,4

La teneur en soufre s'accroît avec la profondeur pour chaque zone de prélèvement. La nature exacte de ce soufre reste à déterminer, les composés organiques soufrés n'ayant pas été dosés. On peut noter des teneurs importantes en oxygène des différents échantillons. De plus le procédé de fabrication passe par des intermédiaires soufrés, ce qui peut expliquer la présence de soufre en quantité importante.

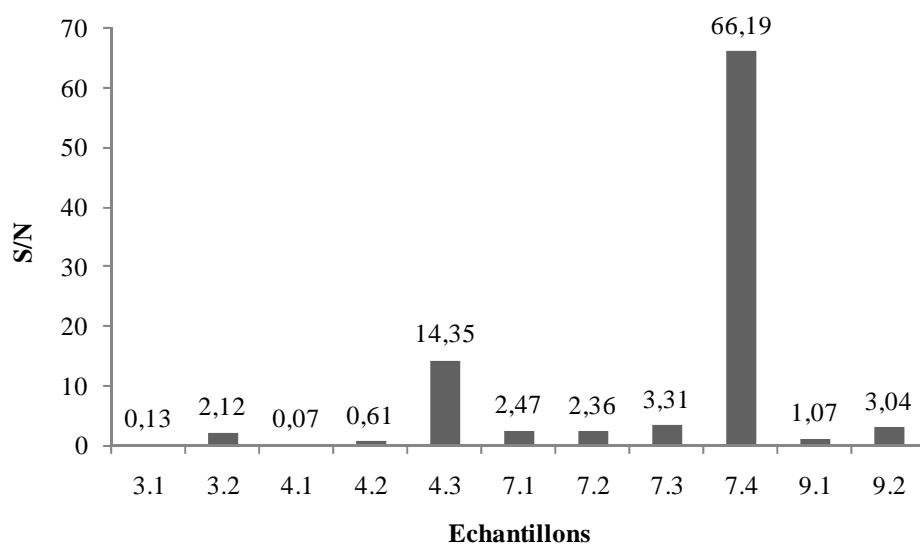


Figure 28 : Rapport soufre/azote des échantillons prélevés dans la lagune.

Le calcul du rapport S/N est montré par la Figure 28. Les zones 4.3 et 7.4 montrent un rapport S/N relativement élevé. Il semble donc que le soufre soit lié à la matière minérale soit

par un sulfate insoluble ou un sulfure puisque les couches riches en soufre sont pauvres en azote dont on sait qu'il est lié au carbone organique. L'observation des profils (Cf description paragraphe II) confirme cette hypothèse.

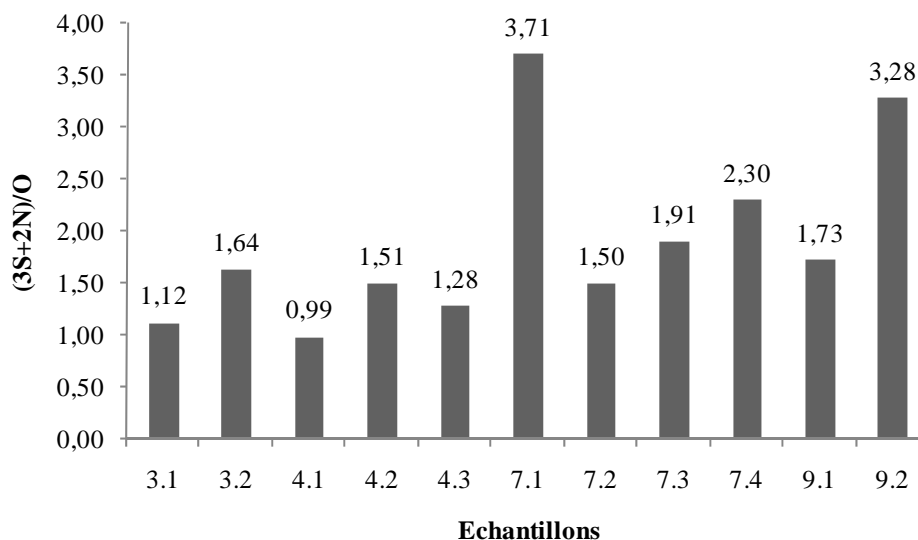


Figure 29 : Rapport (3S+2N)/O des échantillons prélevés dans la lagune

Afin d'évaluer l'origine du soufre et de l'azote, le rapport (3S+2N)/O a été calculé sur les échantillons de la lagune (Figure 29) puisque la fabrication des herbicides peut passer par un intermédiaire soufré. Ainsi, la fraction 3S représente les molécules organiques possédant des groupements sulfonates SO_3 tandis que la fraction 2N représente les molécules organiques possédant des groupements NO_2 . Dans les zones les plus pauvres en soufre, c'est à dire le rapport 2N/O se rapproche de 1, la présence de NO_2 et donc la présence d'explosifs et d'herbicides semble plus importante. Quand le soufre augmente (7-1, 7-4, 9-2), le rapport augmente ce qui indiquerait plutôt la présence de sulfures (pyrites) que de sulfates.

L'ensemble des résultats obtenus sur les sédiments de la lagune montre que la zone étudiée est essentiellement constituée de boues à caractère industriel. Il semble que la concentration en composés organiques ait été largement sous estimée. Cette étude met en évidence la présence de 77 à 99,9% de composés organiques inconnus dont on ignore la toxicité et la possibilité de bioremédiation.

Peu d'études ont été réalisées sur des matrices mélangeant à la fois des explosifs et des herbicides. De plus, les concentrations en nitramines et en composés nitroaromatiques auxquelles nous sommes confrontées sont plus élevées que sur les autres sites similaires répertoriés (Kaake *et al.*, 1992; Simini *et al.*, 2003). Le taux de matière organique élevé, et le

rapport C/N de 3 confirment que cette boue ne résulte que de la sédimentation d'effluents de production durant plusieurs décennies. La nature et la diversité des composés présents dans la lagune illustrent la complexité et l'originalité du matériel étudié. S'il a été possible de rechercher les composés produits par l'usine, en revanche, tous les composés secondaires de toutes les réactions se trouvant dans cette boue n'ont pas été identifiés (nitrites et sulfonates divers).

Chapitre 2.

Mise au point d'un protocole de dosage des composés organiques.

Dans le but d'effectuer des essais de bioremédiation sur les contaminants, la connaissance de la nature et des concentrations des composés organiques est nécessaire. Ces composés peuvent être présents dans les sols ou dans des boues de lagunage, après une contamination d'origine industrielle (explosifs et pesticides), agricole (épandage ou stockage de pesticides) ou encore militaire (explosifs). Il convient de mettre en place des stratégies adaptées à chaque type de matrice et aux composés d'intérêt qui permettront d'obtenir la meilleure quantification et en particulier par la recherche du meilleur rendement d'extraction.

Concernant les explosifs, plusieurs méthodes ont été expérimentées ces dernières années. La méthode EPA SW 846- 8330 mise en place à la fin des années 1980 est la méthode la plus commune pour extraire et analyser les explosifs en traces sur échantillons aqueux comme sur les matrices solides (Jenkins *et al.*, 1989). Lorsque cette méthode est appliquée aux matrices solides, une extraction est réalisée dans un premier temps en ajoutant 10mL d'acétonitrile à 2g de sol qui sont soumis aux ultrasons pendant 18h. Après avoir laissé reposer 30mn, le surnageant est filtré à 0,45µm. L'analyse se fait en HPLC couplée à un détecteur UV à 254nm. Les explosifs de la famille des nitramines et des nitroaromatiques peuvent ainsi être détectés dans l'eau, le sol et le sédiment. Bien qu'efficace, cette méthode possède l'inconvénient majeur d'un temps d'extraction relativement long. Cette méthode d'extraction par ultrasons a également été appliquée à l'extraction des pesticides, avec toutefois une différence, le temps d'extraction beaucoup plus court que pour les explosifs, de l'ordre d'une heure (Gonçalves et Alpendurada, 2005).

L'utilisation de la PLE (Pressurized Liquid Extraction) ou ASE (Accelerated Solvent Extractor) à des températures et pressions élevées est de plus en plus fréquente pour extraire des composés organiques dans des matrices solides telles que les sédiments. Cette technique remplace progressivement des extractions liquides classiques telles que le soxhlet, et les ultrasons grâce à des temps d'extraction plus courts et des volumes de solvants réduits (Ramos *et al.*, 2002).

La PLE a été appliquée à l'analyse environnementale sur différents composés organiques, dont les HAP (Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques) (Wilcke *et al.*, 2002), l'organochlorine et le trichlosan (Senthil *et al.*, 2002), le 4 nonylphénol (Meesters et Schroder, 2002). Par ailleurs les herbicides ont également été extraits sur des sédiments de rivières (Devault *et al.*, 2007). Les explosifs ont également été extraits dans des matrices solides par cette méthode. Ainsi, de l'hexogène a pu être extrait de foies de bœuf (Pan *et al.*, 2005). Zhang *et al.* ont également expérimenté avec succès la PLE sur des sols contenant des

ajouts dosés d'hexogène (2005). Une étude récente caractérise également une extraction d'hexogène et de ses dérivés nitroso sur un sol (par ajout dosé également) par PLE suivie d'une purification par cartouches de florisil (Pan *et al.*, 2006).

A l'heure actuelle, aucune étude connue ne fait mention d'extraction d'explosifs et d'herbicides, et ce sur des matrices contaminées. En effet, comme montré précédemment, la plupart des études réalisées utilisent la PLE sur des sols propres, auxquels un ou plusieurs explosifs sont ajoutés dans de faibles proportions (ajouts dosés). Dans notre cas, la matrice est déjà contaminée, par de hautes teneurs en explosifs, en herbicides ainsi qu'en d'autres composés inconnus (coproduits de synthèse, intermédiaires de réactions,...) ce qui rend l'analyse beaucoup plus complexe. De plus, les concentrations en composés organiques présents dans la boue industrielle sont plus élevées que dans les études classiques. En effet quelques dizaines de mg de sédiment sont suffisantes pour rechercher les composés d'intérêt alors que plusieurs grammes sont souvent nécessaires dans la majeure partie des études pour se situer dans les limites de détection.

La PLE comporte l'avantage de limiter le volume de solvant utilisé pour procéder à l'extraction et le temps d'extraction. Lors de notre étude, l'extraction et le dosage des composés organiques seront réalisés sur le sédiment de la zone 4 et plus particulièrement l'échantillon de surface 4.1. Ce dernier comporte le taux de pollution le plus élevé et la diversité en produits contaminants la plus large tant au niveau des pesticides que des explosifs. C'est pour ces mêmes raisons que cet échantillon sera utilisé pour réaliser les essais de bioremédiation.

I. Expériences d'extraction et dosage sur matrice solide

A. Principe de l'extraction par ASE

Les extractions sont réalisées grâce à une ASE 200 (Accelerated Solvent Extractor, Dionex, Salt Lake City, Utah). Cet appareil permet de faciliter significativement la préparation d'échantillons solides. Pour cela, un solvant est pompé dans une cellule d'extraction contenant l'échantillon qui est alors porté à une température et une pression permettant d'obtenir des conditions proches du supercritique. Après quelques minutes, l'extrait est transféré de la cellule à un tube collecteur. Le procédé d'extraction est totalement automatisé et permet une extraction rapide consommant de faibles quantités de solvant.



Figure 30 : Extracteur à Solvants Accélérés (Dionex).

B. Mise au point du protocole

a) Extraction

Chaque extraction est réalisée sur 0,1g d'échantillon préalablement séché. Ce dernier est placé dans une cellule de 22mL remplie à mi hauteur par de l'hydromatrix (matrice inerte permettant d'obtenir des conditions de pression favorables à l'extraction pour une faible quantité de sédiment contenu dans la cellule). Dans un premier temps, une extraction a été lancée en utilisant le méthanol comme solvant. La pression appliquée à l'intérieur de la cellule est fixée à 1500 psi et la température du four à 100°C. Deux phases d'extraction de 5mn se succèdent avec un volume de rinçage est fixé à 60% du volume de la cellule (protocole appliqué par un laboratoire de la DGA et recommandé par Dionex). La durée totale du cycle d'extraction est de 14mn.

Par la suite, l'échantillon extrait a été passé en HPLC-MS. L'optimisation des conditions d'extraction au méthanol n'a pas été poursuivie, les herbicides n'étant pas retrouvés par cette méthode.

Sachant que notre analyse ne se restreint pas aux explosifs, il est nécessaire d'extraire la majorité des composés organiques présents dans la lagune. Or, des études montrent que des

mélanges Acétone-Hexane ont permis d'extraire des anilides dans des fruits par la méthode du soxhlet (Bazoobandi *et al.*, 2000). Ainsi, une adaptation du protocole a permis d'extraire à la fois les explosifs et les herbicides.

Un second protocole d'extraction a donc été appliqué en utilisant plusieurs solvants, augmentant la capacité d'extraction. En effet un premier cycle d'extraction (avec deux phases de 5mn conditions de rinçage identiques au protocole précédemment décrit) a été réalisé utilisant un mélange Hexane/Acétone à 50°C de 14mn. Grâce à ce premier cycle, 37mL de solvants ont suffi à extraire les composés présents dans le sédiment. Deux cycles d'extractions supplémentaires ont été réalisés sur le même échantillon, à savoir un cycle Acétone/Hexane à 100°C et un cycle Méthanol à 100°C. Ces deux cycles ont également été passés en HPLC, aucun composé n'a été détecté, ce qui montre l'épuisement total du sédiment après la première extraction à 50°C.

b) Analyse chromatographique

Préalablement à chaque dosage, il a été nécessaire d'analyser des standards d'explosifs et d'herbicides qui ont permis d'établir des courbes de calibration. Ainsi, comme le montre la Figure 31, des standards ont été passés en HPLC-MS afin d'obtenir une courbe de calibration permettant la quantification de l'octogène et de l'hexogène.

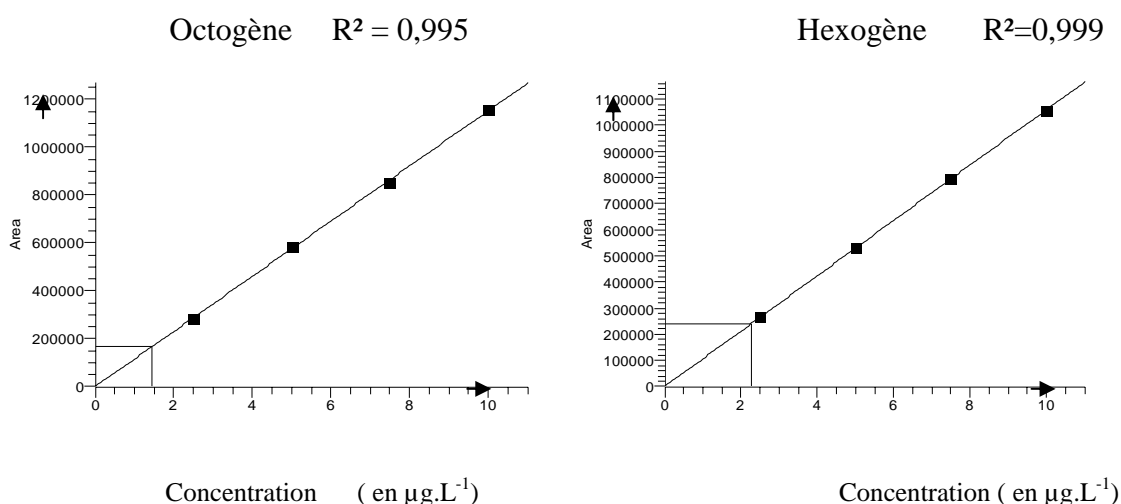


Figure 31 : Courbe d'étalonnage obtenue pour l'octogène et l'hexogène pour effectuer la quantification par détection en masse.

La Figure 32 montre un chromatogramme en masse obtenu après passage de l'échantillon de la zone 4.1 en HPLC après cette première extraction. Nous pouvons observer les pics spécifiques de l'octogène de l'hexogène, du Dinoseb et du Dinoterb.

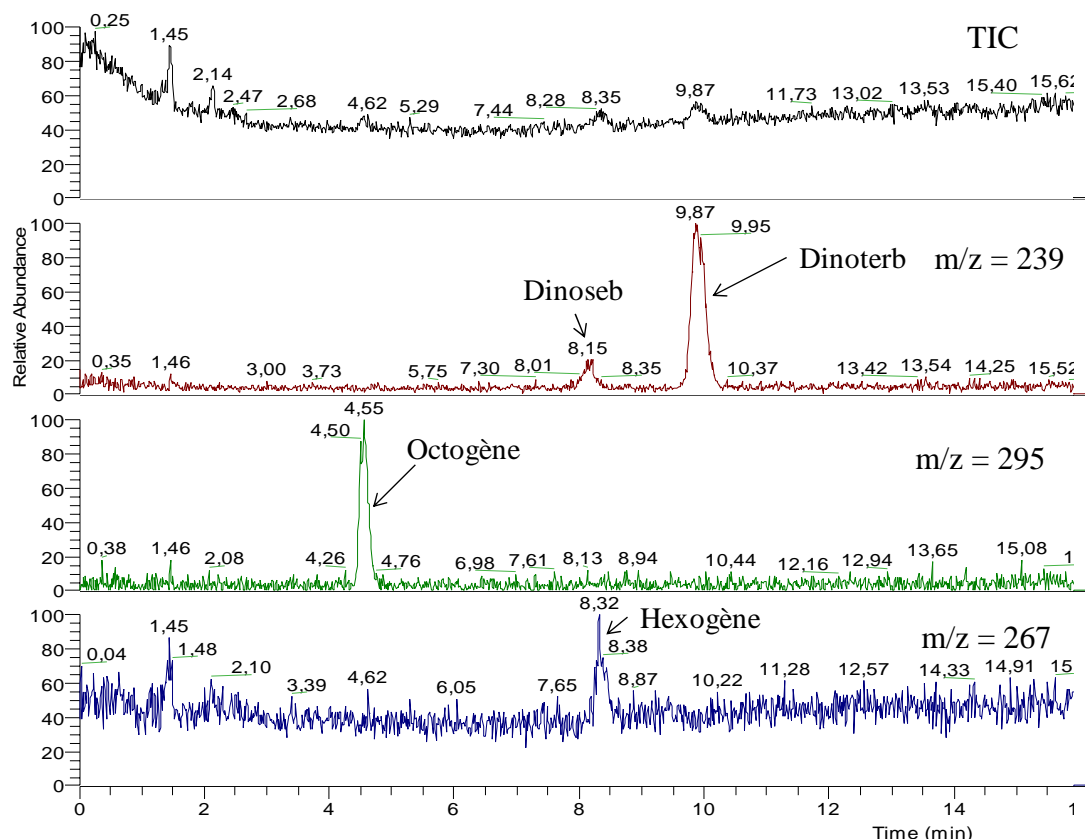


Figure 32 : Chromatogrammes obtenus avec les masses des ions spécifiques trouvés dans l'échantillon de la zone 4.1 après extraction par un mélange Acétone/Hexane.

Ainsi, un échantillon de la zone 4.1 a pu être quantifié en explosifs et en herbicides. Une dilution préalable du volume d'extrait a été nécessaire avant le dosage (alors qu'une reconcentration est souvent nécessaire dans les études classiques). En effet, après extraction, l'échantillon a été dilué au 1/100^e avant d'être analysé. De plus, le poids de sédiment extrait et le volume d'échantillon issu de l'ASE doivent être pris en compte afin de calculer la concentration en hexogène et octogène du sédiment. Ainsi, l'échantillon de la zone 4.1 contient en surface 70,9 g d'octogène par kg de sol sec, 145,9 g d'hexogène, 87,4 g de Dinoterb et de 9,8 g de Dinoseb. Ce dosage a pu être répété trois fois, en revanche, une contamination passive et importante de l'HPLC par des composés de nature inconnue a eu lieu.

Ces résultats diffèrent des données fournies par le bureau d'étude qui font état de 85 mg.kg⁻¹, 5,55 g.kg⁻¹, 16,17 g.kg⁻¹, et 48,12 g.kg⁻¹ pour l'octogène, l'hexogène, le Dinoseb et le Dinoterb respectivement (voir chapitre précédent).

Cette différence observée peut être expliquée par l'hétérogénéité qui existe au sein de la lagune. De plus, au sein d'une même zone, les prélèvements qui ont servi à effectuer les dosages réalisés par le bureau d'études et les prélèvements effectués par l'ENSAT ne sont pas localisés exactement au même endroit. L'hétérogénéité des dépôts peut expliquer les disparités observées. Si nous reprenons le calcul effectué précédemment pour quantifier le pourcentage de carbone issu des principaux composés que nous avons pu doser, nous arrivons à 58% de carbone dont l'origine reste indéterminée pour la zone 4.

Ces résultats confirment que le sédiment que nous avons à traiter est constitué d'une boue industrielle très complexe. Des composés intermédiaires ont pu se former au cours des réactions de fabrication, de plus, diverses réactions ont également pu avoir lieu dans la lagune (condensations, conjugaisons, substitutions,...).

II. Expériences d'extraction et dosage sur matrice liquide

Ces expériences ont fait l'objet d'un article soumis dans Chemosphere. Cet article précise le protocole d'extraction sur une matrice liquide ainsi que son domaine d'utilisation.

Simultaneous analysis of nitramine and nitrophenolic compounds in wastewater by solid-phase extraction coupled with LC-ESI MS/MS.

Geoffrey Perchet, Georges Merlina, Jean-Claude Revel, Eric Pinelli *

Laboratoire ECOLAB, Ecole Nationale Supérieure Agronomique, Avenue de l'Agrobiopole, BP 32607 Auzeville-Tolosane, F 31326 Castanet-Tolosan Cedex, France,

* Corresponding Author

Contact details: Pinelli Eric

Tel: 033 562193945

Mail: pinelli@ensat.fr

ABSTRACT

Nitration reactions of aromatic compounds are commonly involved in different industrial processes for pharmaceutical, pesticide or military uses. For many years, most of the manufacturing sites used lagooning systems to treat their process effluents. In view of a bioremediation assay, the wastewater of a lagoon was investigated by using HPLC coupled with mass spectrometry. The wastewater was highly concentrated in RDX (hexahydro-1,3,5-trinitro-1,3,5-triazine), HMX (octahydro-1,3,5,7-tetranitro-1,3,5,7-tetrazocine) and two herbicides Dinoterb (2-tert-butyl-4,6-dinitrophenol) and Dinoseb (2-sec-butyl-4,6-dinitrophenol). The analysis method attempted to identify both explosives (RDX and HMX) and the two dinitrophenols present in this contaminated site.

Keywords: SPE; HPLC ESI MS/MS; wastewater; RDX; HMX; Dinoseb; Dinoterb.

INTRODUCTION

For several decades, a wide range of nitro-aromatic and nitramine molecules were processed on the same manufacturing site for pyrotechnic synthesis (e.g. RDX (hexahydro-1,3,5-trinitro-1,3,5-triazine), HMX (octahydro-1,3,5,7-tetranitro-1,3,5,7-tetrazocine), TNT (trinitrotoluene), picric acid or for pesticide synthesis (e.g. nitrophenols such as Dinoseb (2-sec-butyl-4,6-dinitrophenol), Dinoterb (2-tert-butyl-4,6-dinitrophenol)). Wastewater from these plants is often contaminated with complex mixtures of these different xenobiotics. Considering the persistence of nitro-aromatic compounds, this wastewater is today a source of contamination for soils, groundwater and surface water (Beller and Tiemer, 2002). In addition, most of the derivatives are known to be toxic. RDX and its metabolites are currently reported to damage soil and water organisms (Robidoux et al., 2001; Mukhi et al., 2005; Zhang et al., 2006). Robidoux et al. have described significant effects of HMX on the growth and reproduction of the earthworm (*Eisenia andrei*). The Dinoseb 96h LC50 value for Chinook salmon (*Salmo salar*) alevins has been established at 70.6 ppb and 87% mortality for Chinook Salmon alevins was observed after a 96h-exposure to 100 ppb (Viant et al., 2006). Dinoterb is reported to have hepatotoxic effects between 10 and 100 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ after 2 hr of incubation on rat hepatocytes and becomes much more toxic for a 24hr exposure. Dinoterb was withdrawn from sale in April 1998 by the European Authorities (decision 98/269/CE) and nitrophenols are registered as priority pollutants (HR-3 grade) by the US EPA (US EPA, 1976).

Solid Phase Extraction (SPE) carried out with a specially cleaned divinyl benzene-vinylpyrrolidone copolymer resin (Porapak RDX) was comparable to the more conventional salting-out solvent extraction method used for nitramine and nitro-aromatic explosive compounds in water (Jenkins et al., 1994). Conjointly, it has been reported that SPE could also be applied as an appropriate herbicide extraction procedure (Hogenboom et al., 1999; Hu et al., 1999). A large variety of different techniques for the analysis of explosives have been developed. High-performance liquid chromatography with ultraviolet detection (HPLC-UV) was firstly used as a standard method for ammunition analysis on the direct solvent extract or on the solid-phase extract (Harvey and Clauss, 1996). Then, the combination of electrospray (ESI) with mass spectrometry (MS) was successfully performed for the HPLC analysis of explosives (Gapeev et al., 2003; Mathis and McCord, 2005). Among the large number of analytical methods developed to monitor the presence of pesticides, an isocratic HPLC method coupled with diode array detection was used for the analysis of nitrophenol pesticides

and related compounds (Galeano Diaz et al., 2001). LC/APCI/MS was proposed for the assay of pesticides in water (Hu et al., 1999). Liquid chromatography with mass spectrometric detection (LC-MS) was also applied for the analysis of nitrophenols (Pamme et al., 2001). With the current use of soft ionization techniques in LC-MS, the use of tandem mass spectrometry (MS/MS) enabled the compulsory confirmation of compound identification (Hogenboom et al., 1999). Presently, analytical tools to assess the level of contamination of an explosive- and/or herbicide-contaminated site are limited.

The goal of the present study is to describe a simple and selective method for the assay of two nitramine compounds (RDX and HMX) and two dinitrophenolic herbicides (Dinoterb and Dinoseb) in wastewater contained in an old industrial lagoon. After SPE of the wastewater, the compounds were investigated by a multi residue approach using ESI-LC/MS in the negative mode and taking into account the same molecular weight and the proximal physico-chemical characteristics of Dinoseb and Dinoterb by the MS/MS mode. This approach comes in response to the need for sensitive and reliable analytical methods for the simultaneous assay of organic compounds from several families.

MATERIALS AND METHODS

Samples

Our contaminated material, wastewater from an old decantation lagoon which received effluent from a military manufacturing plant for about 100 years, contained at least 4 nitrified cyclic compounds (RDX, HMX, Dinoseb (2-sec-butyl-4,6-dinitrophenol) and Dinoterb (2-tert-butyl-4,6-dinitrophenol)). The samples were stored at 4°C until extraction.

Chemicals

Standard Dinoseb and Dinoterb herbicides (Figure 1 A) were purchased from Cluzeau Info Labo (Paris, France). Standard explosives RDX and HMX (Figure 1 B) were obtained from Restek (Paris, France). Methanol, acetonitrile and HPLC grade water were obtained from Fisher Analytics (Illkirch, France). Helium was provided by Air liquid, (Labège, France). Nitrogen (purity > 99.9%) was provided by a nitrogen generator NM18LA, (F-DBS, Courtaboeuf, France).

Extraction of explosives and herbicides

As the solubility of these organic compounds changes with pH, the wastewater pH was adjusted to 7.5. Solid Phase Extraction (SPE) Porapak RDX cartridges (Waters, Massachusetts) were used to extract both explosive and herbicide compounds. SPE cartridges were conditioned prior to sample extraction with 5mL acetonitrile. Acetonitrile was then flushed from the cartridges using 30 mL of reagent grade water. Care was taken to ensure that the cartridges were never allowed to dry after the initial cleaning. A 5-mL aliquot of sample was vacuum-siphoned at a flow rate of 10 mL/mn through the SPE cartridge. Organic compounds were then eluted from the SPE cartridge with 5mL of acetonitrile. The eluate was diluted 1/50 and transferred to an HPLC autosampler vial (Thermo Fisher) for analysis.

Analysis of explosives and herbicides

The concentrations of HMX, RDX, Dinoseb and Dinoterb were identified using a high-performance liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS) system (Surveyor Pump, Thermo; Surveyor Autosampler, Thermo). Ten μL of the extract were injected into the HPLC system equipped with a reverse-phase column (Hypersil ODS C18, 3μ , 4.6mm I.D. x 150mm, Thermo). The solvent systems used were a mixture of solvent A (methanol) and solvent B (HPLC grade water). Compounds were eluted at a flow rate of $0.8\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ under a gradient starting with 26% of solvent A, ending at 74% of solvent A in 18 mn.

Mass spectrometry was performed with an ion trap spectrometer (LCQ Advantage Max, Thermo). The tune function was used to optimize essential parameters of the ESI-MS system. Other conditions, such as capillary temperature or nitrogen gas flow, were manually optimized. The final ESI-MS conditions are reported in Table 1. For all ESI-MS and ESI-MS/MS measurements, solutions of explosives were continuously infused by means of a syringe pump.

Scan parameters were set from m/z 100 to 600 amu in full-scan investigations. A negative-ion ESI mass spectrum of Dinoseb and Dinoterb was acquired by flow injection into an eluent consisting of methanol: water (50:50), leading to a common molecular ion with an m/z value of 239 amu. The MS/MS mode was used to separate Dinoseb and Dinoterb. The collision energy for each ion transition was optimized to produce the highest intensity of the selected ion peak and a common optimized relative collision energy of 42% was used for all MS/MS works.

The concentrations of potential explosives and herbicides were investigated using a high performance liquid chromatography separation device coupled with detector-mass

spectrometry (LC-MS) by comparing the areas under the curve obtained to those of the corresponding calibration sample. Concentrations of herbicides (Dinoseb and Dinoterb) and explosives (RDX and HMX) were quantified using the Excalibur data system from Thermo Fisher.

RESULTS AND DISCUSSION

In this study, SPE was used to clean complex wastewater samples from the impurity and mineral salt load in contrast to the common use as a pre-concentration step for explosives (Smith et al., 2003). The recovery percentages on extraction cartridges for Dinoseb, Dinoterb, RDX and HMX were estimated at 87 (+/-2 %), 87 (+/- 3 %), 86 (+/- 1%) and 90 % (+/-3 %) respectively with a 0.5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ reference solution.

Retention times, molecular weights, detected ions, limits of detection (LODs) and limits of quantification (LOQs) of standards using ESI-LC-MS are presented in Table 2. The use of a gradient elution method allowed us to distinguish both explosives from Dinoseb and Dinoterb. The criteria for estimating the LODs were the smallest amount injected that yielded a signal-to-noise ratio greater than 3 for the mass chromatogram based on the characteristic ions. LODs were measured for these compounds by a triplicate injection from a series of solutions in methanol. The correlation coefficient varied in the range of 0.950 to 0.999 for all the investigated analytes.

As shown by Figure 2, the total ion current (TIC) chromatogram obtained in the ESI negative mode (A) authorized the extraction of the mass spectra of each component of the explosive mix (B, C and D) showing the characteristic ions of each one. HMX is well identified by LC-MS in the negative mode since the $[\text{M} + \text{NO}_2 - \text{H}]^-$ cluster ion constitutes the most abundant ion (mass spectrum B). Another cluster ion is observed at m/z 355, and concerns the $[\text{M} + \text{NNO}_2 - \text{H}]^-$ structure. Like HMX, RDX forms the same couple of cluster ions $[\text{M} + \text{NO}_2 - \text{H}]^-$ and $[\text{M} + \text{NNO}_2 - \text{H}]^-$ (mass spectrum C). This case has been reported previously (Yinon et al., 1997)). Fragmentation processes characterized by losses of CH_2NNO_2 , NNO_2 , NO_2 and NNO are represented by the ions $m/z=226$ and $m/z=197$ under our experimental conditions for these molecules. This route predominates with TNT, characterized by a signal at 226 corresponding to the deprotonated parent ion $[\text{TNT-H}]^-$ whereas $m/z = 197$ concerns the ion $[\text{TNT-NO}]^-$ resting form in accordance with other studies (Yinon *et al.*, 1997; Groom *et al.*, 2005).

As shown in Figure 3, a good separation between the herbicides was observed for Dinoseb and Dinoterb as seen by their common molecular ion m/z 239. In addition to their different retention times, MS/MS gives another proof of their respective identities (Figure 4). The ESI-MS/MS spectrum showed two specific ions at m/z = 194 and m/z = 221 for Dinoseb, while Dinoterb had a single specific ion at m/z = 207. Studies of the MS/MS spectra of Dinoseb showed that the ion m/z =194 in the MS/MS spectrum is formed through the cleavage in the neutral molecule CH_3NO released from the side chain and the remaining nitrophenolate (Baglio *et al.*, 1999).

This study demonstrates that the use of an SPE method combined with HPLC ESI MS/MS is suited to the analysis of compounds presenting two different ring cycles (nitramine and nitrophenolic compounds) in a complex matrix leading to good separation. As shown in Figure 5, Dinoseb and RDX have the same retention time. Quantification could be carried out by the specific ions of RDX (m/z = 267 and m/z = 281) and Dinoseb (m/z = 239) respectively in the total mass chromatogram.

Under the chromatographic conditions described in our study the concentrations of HMX, RDX, Dinoseb and Dinoterb were 4.03 mg.L⁻¹, 25 mg.L⁻¹, 1.34 mg.L⁻¹ and 2.87 mg.L⁻¹ respectively, in the investigated wastewater sample.

In conclusion, LC/MS/MS appears to be a powerful technique for the analysis of nitramine and nitro-aromatic compounds. This method enables the sensitive and selective assay of 2 nitramines (RDX and HMX) and 2 nitroaromatic compounds (Dinoseb and Dinoterb). MS/MS clearly discriminated Dinoterb and Dinoseb. Other nitro-aromatic compounds like TNT can also be detected even if they were not present in the wastewater studied.

Acknowledgements

This work was supported by grant N° 03-79-144 from the Direction Générale de l'Armement (DGA, France). We would like to thank Mr Pechoux and Mr Mericam-Bourdet from DGA. We also thank Mr Spyckerelle (EURENCO, France) for his welcome advice on safety.

REFERENCES

Baglio, D., Kotzias, D., Larsen, B.R., 1999. Atmospheric pressure ionisation multiple mass spectrometric analysis of pesticides. *J Chromatogr A* 854, 207-220.

Beller, H.R., Tiemer, K., 2002. Use of liquid chromatography/tandem mass spectrometry to detect distinctive indicators of in situ RDX transformation in contaminated groundwater. *Environ Sci Technol* 36, 2060-2066.

Galeano Diaz, T., Guiberteau, A., Ortiz, J., López, M., Salinas, F., 2001. Use of neural networks and diode-array detection to develop an isocratic HPLC method for the analysis of nitrophenol pesticides and related compounds. *Chromatographia* 53, 40-46.

Gapeev, A., Sigman, M., Yinon, J., 2003. Liquid chromatography/mass spectrometric analysis of explosives: RDX adduct ions. *Rapid Commun Mass Spectrom* 17, 943-948.

Groom, C.A., Halasz, A., Paquet, L., Thiboutot, S., Ampleman, G., Hawari, J., 2005. Detection of nitroaromatic and cyclic nitramine compounds by cyclodextrin assisted capillary electrophoresis quadrupole ion trap mass spectrometry. *J Chromatogr A* 1072, 73-82.

Harvey, S.D., Clauss, T.R., 1996. Rapid on-line chromatographic determination of trace-level munitions in aqueous samples. *J Chromatogr A* 753, 81-89.

Hogenboom, A.C., Niessen, W.M., Little, D., Brinkman, U.A., 1999. Accurate mass determinations for the confirmation and identification of organic microcontaminants in surface water using on-line solid-phase extraction liquid chromatography electrospray orthogonal-acceleration time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom* 13, 125-133.

Hu, J.-Y., Aizawa, T., Magara, Y., 1999. Analysis of pesticides in water with liquid chromatography/atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry. *Water Research* 33, 417-425.

Jenkins, T.F., Miyares, P.H., Myers, K.F., McCormick, E.F., Strong, A.B., 1994. Comparison of solid phase extraction with salting-out solvent extraction for preconcentration of nitroaromatic and nitramine explosives from water. *Analytica Chimica Acta* 289, 69-78.

Mathis, J.A., McCord, B.R., 2005. The analysis of high explosives by liquid chromatography/electrospray ionization mass spectrometry: multiplexed detection of negative ion adducts. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 19, 99-104.

Mukhi, S., Pan, X., Cobb, G.P., Patino, R., 2005. Toxicity of hexahydro-1,3,5-trinitro-1,3,5-triazine to larval zebrafish (*Danio rerio*). *Chemosphere* 61, 178-185.

Pamme, N., Steinbach, K., Ensinger, W.J., Schmidt, T.C., 2001. Analysis of polynitrophenols and hexyl by liquid chromatography-mass spectrometry using atmospheric pressure ionization methods and volatile ion-pairing. *J Chromatogr A* 943, 47-54.

Robidoux, P.Y., Hawari, J., Thiboutot, S., Ampleman, G., Sunahara, G.I., 2001. Chronic toxicity of octahydro-1,3,5,7-tetranitro-1,3,5,7-tetrazocine (HMX) in soil determined using the earthworm (*Eisenia andrei*) reproduction test. *Environmental Pollution* 111, 283-292.

Smith, M., Collins, G.E., Wang, J., 2003. Microscale solid-phase extraction system for explosives. *J Chromatogr A* 991, 159-167.

Viant, M.R., Pincetich, C.A., Hinton, D.E., Tjeerdema, R.S., 2006. Toxic actions of dinoseb in medaka (*Oryzias latipes*) embryos as determined by in vivo ³¹P NMR, HPLC-UV and ¹H NMR metabolomics. *Aquatic Toxicology* 76, 329-342.

Yinon, J., McClellan, J.E., Yost, R.A., 1997. Electrospray ionization tandem mass spectrometry collision-induced dissociation study of explosives in an ion trap mass spectrometer. *Rapid Commun. Mass Spectrom* 11, 1961-1970.

Zhang, B., Freitag, C.M., Canas, J.E., Cheng, Q., Anderson, T.A., 2006. Effects of hexahydro-1,3,5-trinitro-1,3,5-triazine (RDX) metabolites on cricket (*Acheta domesticus*) survival and reproductive success. *Environmental Pollution* 144, 540-544.

Figure Captions

Figure 1. Molecular structure of the herbicides studied (Dinoseb and Dinoterb) and explosives (RDX and HMX).

Figure 2. Mass analysis of standard explosives. (A: Total Ionic Current for the explosive mix obtained in the ESI mode. B: Mass spectrum for HMX. C: Mass spectrum for RDX. D: Mass spectrum for TNT).

Figure 3. Negative-ion ESI Mass chromatograms obtained for the two dinitrophenols Dinoseb and Dinoterb.

Figure 4. Negative ion ESI-MS/MS mass spectrum of dinitrophenols Dinoseb and Dinoterb.

Figure 5. Negative ion ESI-MS total ionic current chromatogram (A) for the studied wastewater sample and specific ion chromatograms for Dinoseb and Dinoterb (B), for HMX (C) or RDX (D).

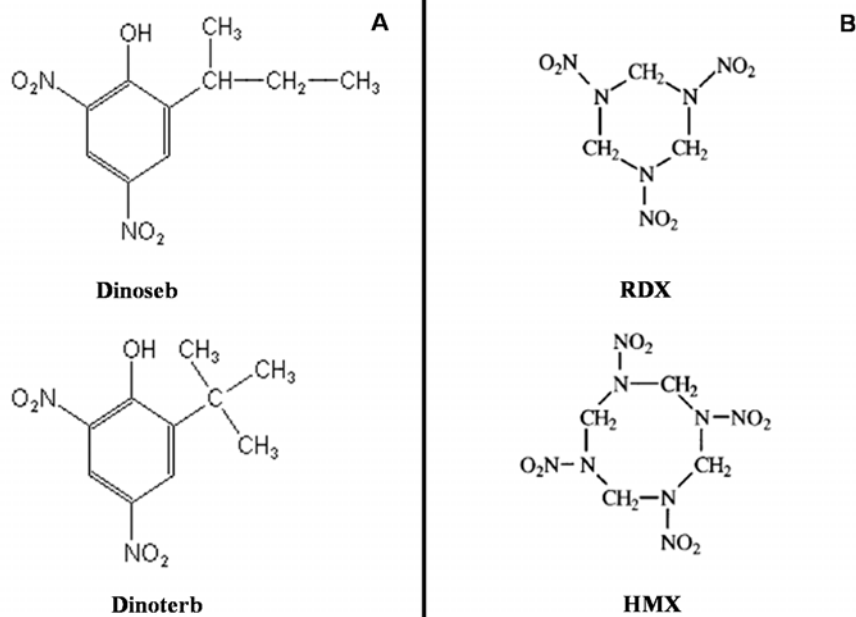


Figure 1

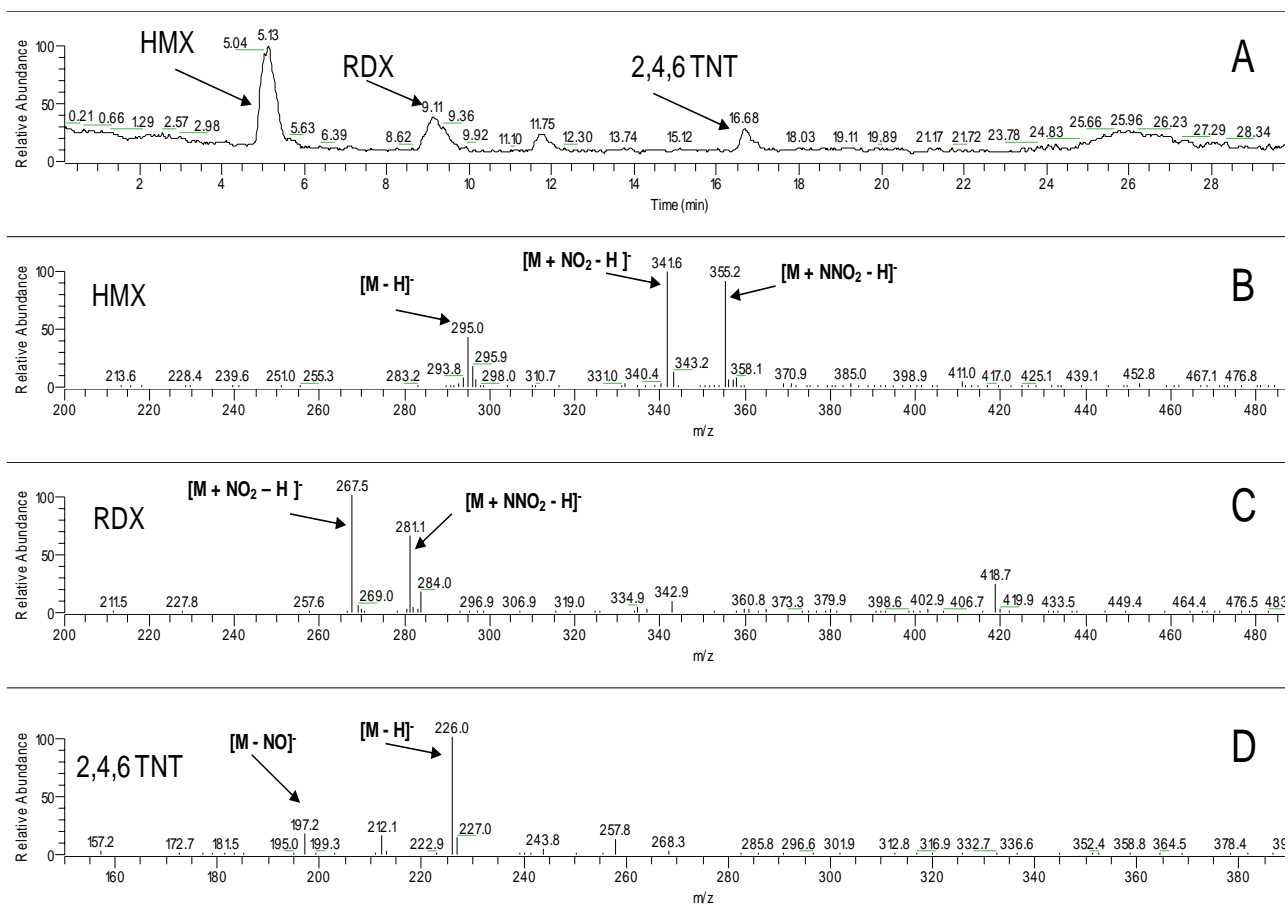


Figure 2

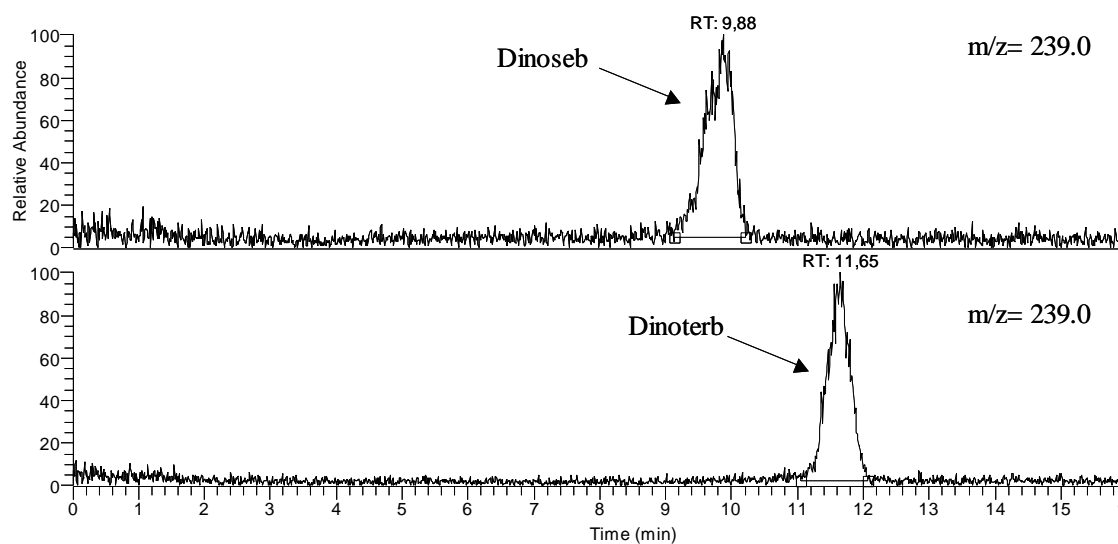


Figure 3

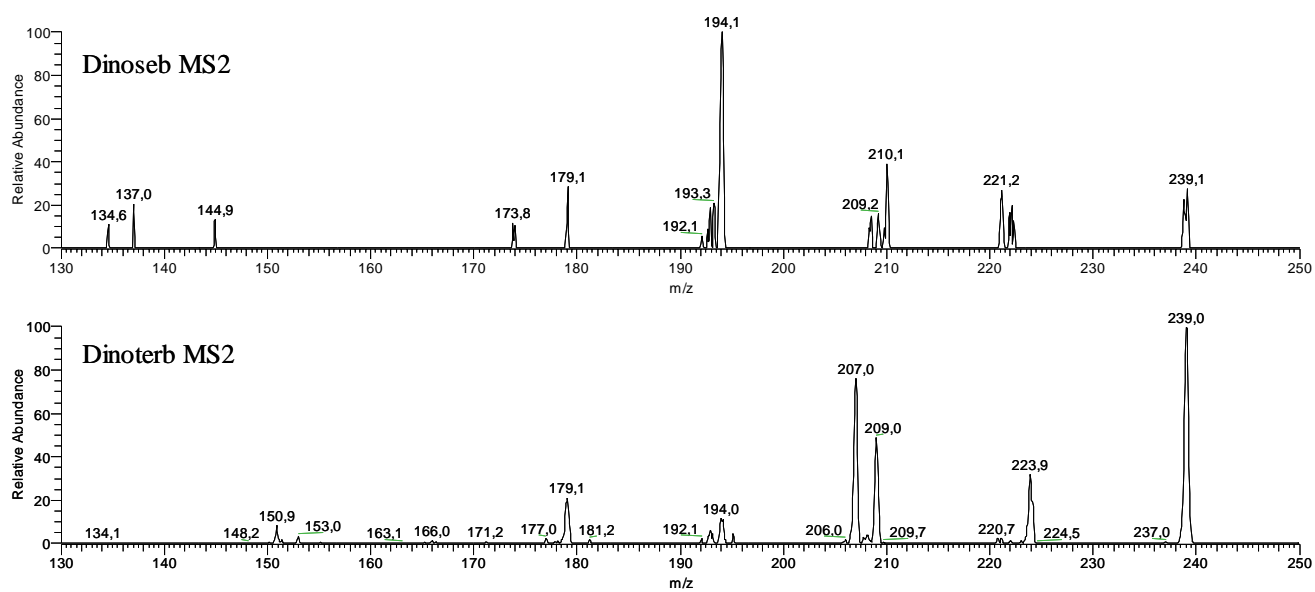


Figure 4

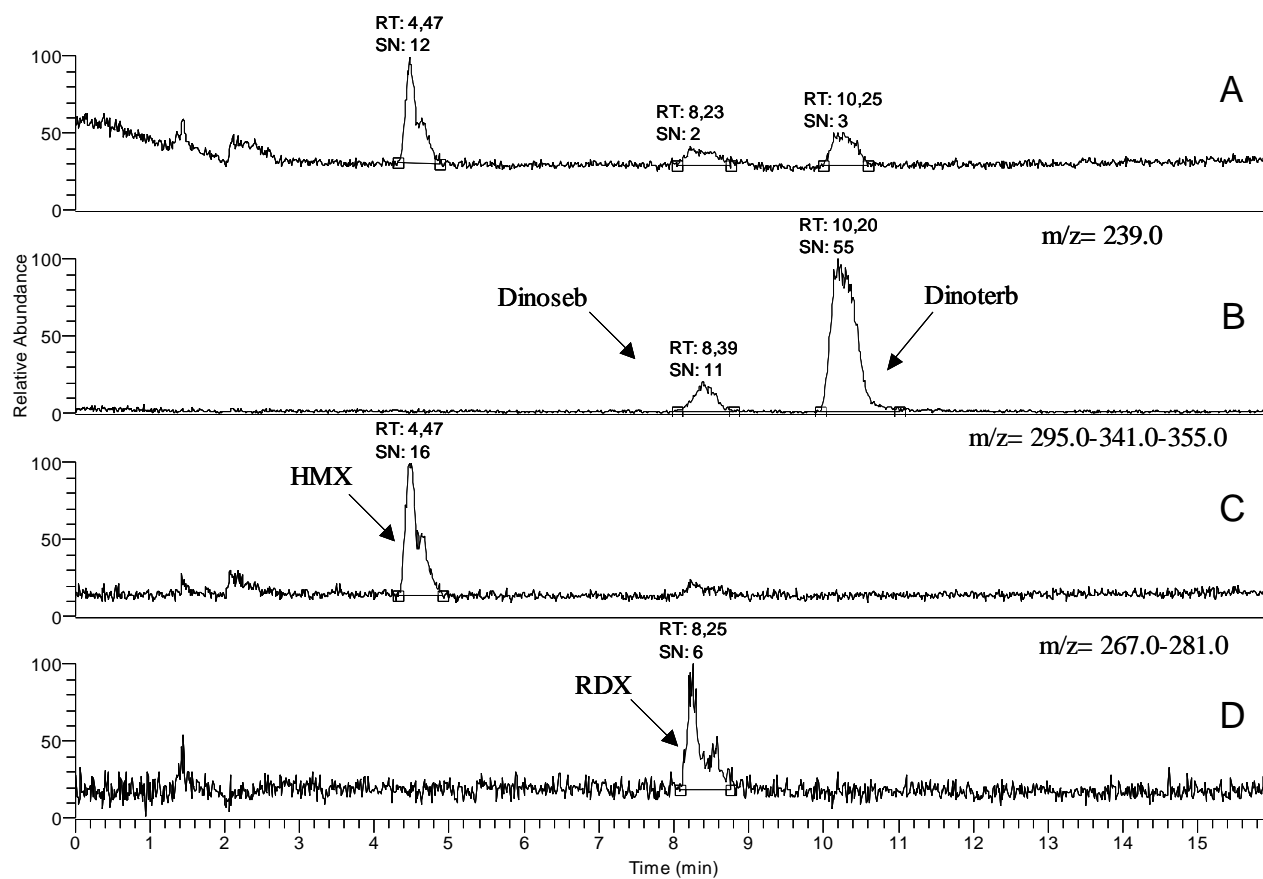


Figure 5

Table captions

Table 1: Source parameters for LCQ ion trap mass spectrometer for electrospray ionization configuration.

Table 2: Retention time, molecular weight, detected ions, limits of detection ($\mu\text{g. L}^{-1}$) and method detection limits in mass spectrometry ($\mu\text{g. L}^{-1}$) for the studied compounds.

Table 1

ESI Source	Ion optics
Mode: negative	Capillary temp ($^{\circ}\text{C}$): 280
Ion spray voltage (kV): 4	Multiple 1 offset (V): 2.25
Sheath gas flow rate (UA): 40	Tube Lens offset (V): 0
Aux/sweep gas flow rate (UA): 10	Multiple 2 offset (V): 5
Capillary voltage (V): -6	Multiple RF Amp (Vp-p, sp): 400

Table 2

Retention Time	Analyte	MW	ions Detected in negative ESI (relative abundance)	LOD in Mass ($\mu\text{g. L}^{-1}$)	LOQS ($\mu\text{g. L}^{-1}$)
8.39	Dinoseb	240	239	5	100
10.20	Dinoterb	240	239	5	100
4.47	HMX	296	295	1	200
8.25	RDX	222	267	20	300

La méthode mise au point dans l'article précédent a permis de doser deux dinitrophénols et deux nitramines dans une solution de sédiment. Ce protocole sera utilisé par la suite afin d'analyser l'évolution de l'hexogène, de l'octogène, du Dinoseb et du Dinoterb dans la phase liquide de différentes conditions de bioremédiation. De plus, d'autres composés, même s'ils ne sont pas identifiés peuvent également être dégradés ou transformés lors des différents procédés de traitement.

Chapitre 3.

Caractéristiques microbiologiques du sédiment

Ce bilan est basé sur l'identification des différentes communautés de microorganismes présentes dans les sédiments de la lagune.

Dans un premier temps, une étude des populations présentes dans la lagune a permis d'observer la distribution globale des bactéries, indiquant ainsi si ces dernières ont colonisé la lagune de façon uniforme. L'ADN extrait des bactéries a été soumis à une t-RFLP (terminal Restriction Fragment Length Polymorphism). Cette étape permet de déterminer le polymorphisme entre les fragments d'ADN et par conséquent les différentes familles de microorganismes présents dans les sédiments. Comme le rappelle la Figure 33, la lagune est caractérisée par une hétérogénéité de contamination. L'analyse t RFLP peut révéler une éventuelle corrélation entre les niveaux de contamination et la diversité en termes de populations microbiennes.

Rappel :

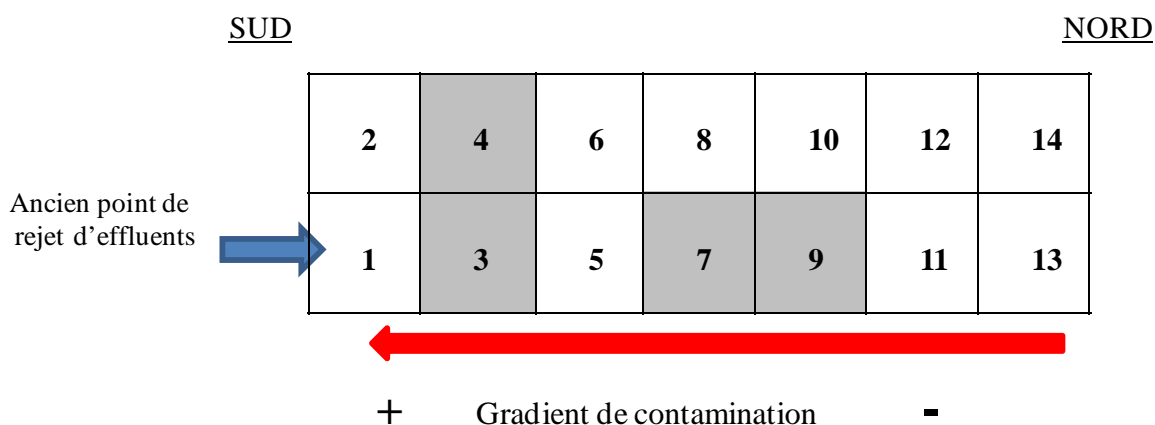


Figure 33 : Maillage de la lagune

Par la suite, l'identification précise des espèces de bactéries présentes a été réalisée en utilisant le clonage et le séquençage de l'ARN ribosomal des bactéries présentes dans le sédiment de la zone 4.1. En effet, la diversité et la concentration en molécules sont les plus élevées dans cette zone. De plus, les prélèvements effectués sur cette zone ont été sélectionnés pour les essais de bioremédiation, d'où la nécessité de connaître précisément de sa flore microbienne.

I. Dispositif expérimental destiné à l'identification des microorganismes

A. Extraction et dosage de l'ADN

L'extraction est réalisée à l'aide d'un kit d'extraction (Ultraclean Soil DNA kit, Mo Bio). La présence d'ADN génomique est vérifiée par électrophorèse sur gel d'agarose à 1%. Les gels sont immergés dans un tampon Tris Borate. Un volume de 5µL d'ADN additionné de 2µL de tampon de charge (glycérol, bleu de bromophénol) est déposé pour chaque échantillon. La migration se fait pendant 30mn à 100V. Un marqueur de poids moléculaire (S L) a servi de témoin de référence. La révélation se fait en présence de Bromure d'Ethydium (BET = agent intercalant) qui permet de visualiser les acides nucléiques. La Figure 34 montre la présence d'acides nucléiques dans les échantillons extraits.

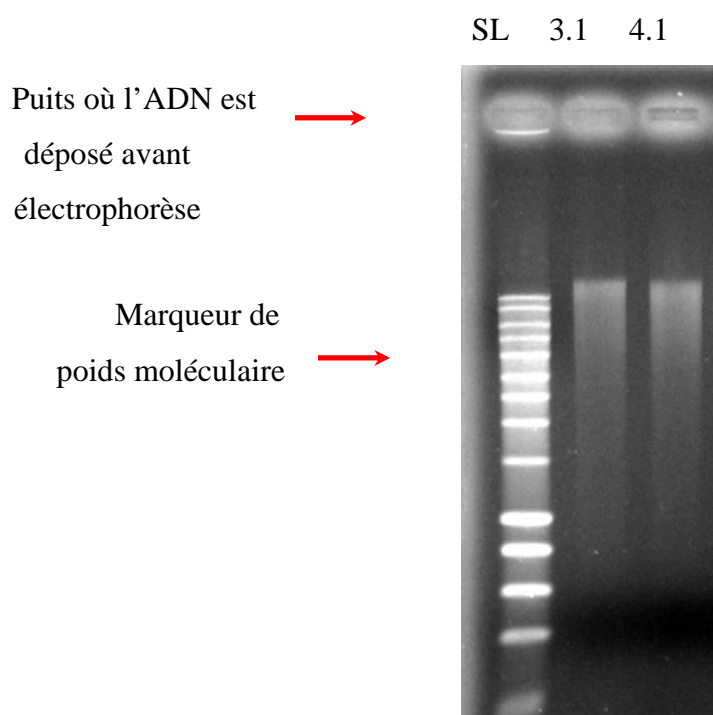


Figure 34 : Gel d'électrophorèse montrant la qualité des ADN extraits à partir des sédiments et des enrichissements (SL = Smart Ladder).

La première colonne (SL) montre le marqueur de poids moléculaire avec les différentes tailles de molécules représentées par des bandes blanches. Les deux colonnes suivantes montrent l'ADN présent dans les échantillons 3.1 et 4.1 prélevés dans la lagune.

B. Analyse t-RFLP

La t-RFLP a été appliquée sur les prélèvements effectués dans les 4 zones de la lagune. Grâce à l'utilisation d'amorces marquées par des sondes fluorescentes, la t-RFLP permet de déterminer, après séparation électrophorétique, le polymorphisme des fragments de restriction en position terminale et de caractériser la diversité de la population microbienne.

Après amplification par PCR avec des amorces marquées au tetrachloro-carboxyfluorescéine (TET) pour l'amorce sens et à l'hexachlorocarboxyfluorescéine (HEX) pour l'amorce anti-sens, chaque échantillon a été digéré par deux enzymes de restriction.

Les échantillons ont été dénaturés en présence de formaldéhyde pendant 2mn à 95°C. La séparation des fragments a été réalisée par électrophorèse capillaire dans un séquenceur (ABI PRISM™ 310 genetic Analyser, Applied Biosystems). Après une injection de 10s, ils ont migré sous un voltage de 50 volts pendant 30mn à 60°C dans un capillaire contenant un gel polymère (gel de polyacrylamide Pop4). Les fragments de restriction ont été séparés selon leur taille qui est calculée par comparaison avec un marqueur de taille (TAMRA). Seuls les fragments en position terminale contenant l'amorce fluorescente ont été détectés. Une analyse préliminaire des profils électrophorégrammes a été réalisée grâce au logiciel Genescan (ABI).

Tableau 14 : Séquences nucléotidiques des amorces.

Amorces 16s	Séquences 5' 3'	Température d'hybridation
8F tet	AGA GTT TGA TCC TGG CTG AG	52°C
1489 hex	TAC CTT GTT ACG ACT TCA	52°C

Ces séquences nucléotidiques appartiennent aux amorces spécifiques des sondes utilisées lors de la PCR.

C. Séquençage génétique

Le séquençage a été entrepris sur le sédiment de la zone 4.1 de surface, ce dernier étant utilisé pour les essais de bioremédiation.

a) Amplification

La technique de PCR a permis d'amplifier un fragment d'ADN à partir de deux amorces spécifiques d'oligonucléotides (séquences complémentaires des brins 3' et 5'). Elle repose sur la synthèse enzymatique d'ADN par une ADN polymérase thermostable à partir de deux

amorces de polarité opposée et dont la séquence est spécifique de chacune des bornes du fragment à amplifier. Le principe de la PCR est décrit sur la Figure 35.

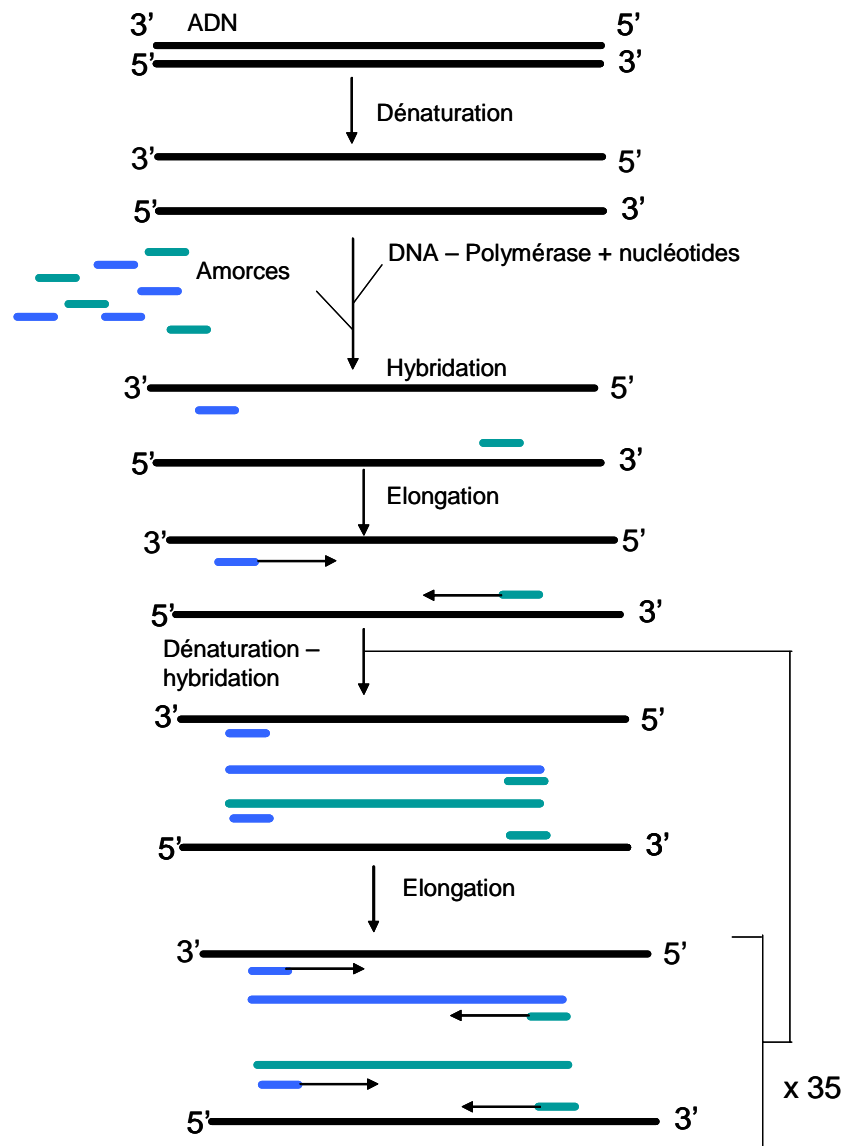


Figure 35 : Représentation schématique d'une amplification par PCR. Dénaturation puis hybridation et enfin extension.

L'ADN des sédiments a été amplifié avec des amorces codant pour une région de l'ARNr 16s du génome bactérien. La PCR a été effectuée en plusieurs étapes, tout d'abord les tubes ont été portés à 94°C durant 5mn ce qui a permis une première phase de dénaturation, une deuxième phase de 45s à 94°C a permis de compléter la dénaturation. Ensuite les tubes ont été portés à 52°C durant 45s ce qui a permis l'hybridation des amorces. L'élongation a alors été rendue possible grâce à une étape à 72°C durant 1mn. Ces étapes ont été répétées 34 fois et suivies d'une élongation finale durant 10mn à 72°C. Un témoin négatif (T) réalisé avec de

l'eau et un témoin positif (T^+) composé d'un ADN bactérien ont également été passés en PCR pour s'assurer du bon déroulement de la technique.

b) Purification

Suite à la phase d'amplification et dans le but du séquençage des fragments amplifiés, une étape de purification a été réalisée. La purification a pour but de se débarrasser des fragments d'ADN simple brin et autres impuretés. La purification a été effectuée à partir d'un kit « GFX PCR DNA and gel band purification kit » de chez Amersham Biosciences. Une colonne GFX a été placée dans un tube collecteur pour chaque purification à effectuer. Du tampon « capture buffer » a été ajouté à chaque colonne à hauteur de 500 μ L. La solution d'ADN a alors été transférée sur la colonne GFX. Une centrifugation de 30 secondes à 13000g a permis de fixer l'ADN sur le filtre. Après s'être débarrassé du filtrat en vidant le tube collecteur, le filtre a été remplacé dans le tube collecteur et 500 μ L de solution de lavage ont été ajoutés à la colonne. Une centrifugation à 13000g pendant 30 secondes a permis de se débarrasser des ADN simple brin et des impuretés. Le filtrat a été à nouveau éliminé et le filtre placé dans un tube de 1.5mL stérile. Un tampon d'élution a été ajouté directement sur le filtre de la colonne à hauteur de 50 μ L. Les échantillons ont alors été incubés 1 mn à température ambiante. Une centrifugation à 13000g pendant 1mn a permis enfin de récupérer l'ADN purifié. Les échantillons d'ADN purifiés ont été conservés au congélateur à -20°C .

c) Clonage

Les produits de PCR purifiés du gène 16S ont été clonés à l'aide du kit TOPO TA cloning d'*Invitrogen*. La bactérie utilisée est la ***TOPO 10F'***. La technique du clonage consiste à insérer les gènes 16S amplifiés et purifiés issus des sédiments de la zone Z4 dans des bactéries de type *Escherichia Coli* dont on connaît parfaitement les conditions de cultures. Certaines bactéries acceptent l'insert (le gène 16S issu des sédiments) et forment des colonies blanches. Les bactéries dites non-recombinantes, qui n'intègrent pas l'insert dans leur plasmide, forment des colonies bleutées. Trois boîtes de Pétri par échantillon ont étéensemencées avec respectivement 50 μ L, 90 μ L et 100 μ L du mix.

d) Amplification de l'insert

L'insert a ensuite été amplifié par PCR. 94 clones ont été amplifiés d'après le mix présenté dans le Tableau 15. Les cycles de la PCR sont définis dans le Tableau 16.

Tableau 15 : Composition du mix PCR pour l'amplification de l'insert

MIX PCR	x 1	x 100
Tampon	2,5 µL	250 µL
MgCl₂ (50mM)	0,75 µL	75 µL
Amorce M13 F (20 µM)	0,5 µL	50 µL
Amorce M13 R (20 µM)	0,5 µL	50 µL
dNTP (20 mM)	0,5 µL	50 µL
Taq	0,25 µL	25 µL
Eau	20 µL	2 mL
Vt	25 µL	2,5mL

Tableau 16 : Description des étapes de la PCR

Etapes	Température	Durée
1	94°C	5min
2	94°C	45 min
3	52°C	45 s
4	72°C	1 min
5	Go to étape 2, 34 fois	
6	72°C	10 min

e) Digestion Enzymatique

Après avoir purifié les ADN, ceux-ci ont été coupés par des enzymes de restriction afin de permettre de différencier les séquences de chaque ADN amplifié. Dans notre étude, Hae III et Hinp I ont été utilisées. Le principe de la digestion est expliqué dans la Figure 36.

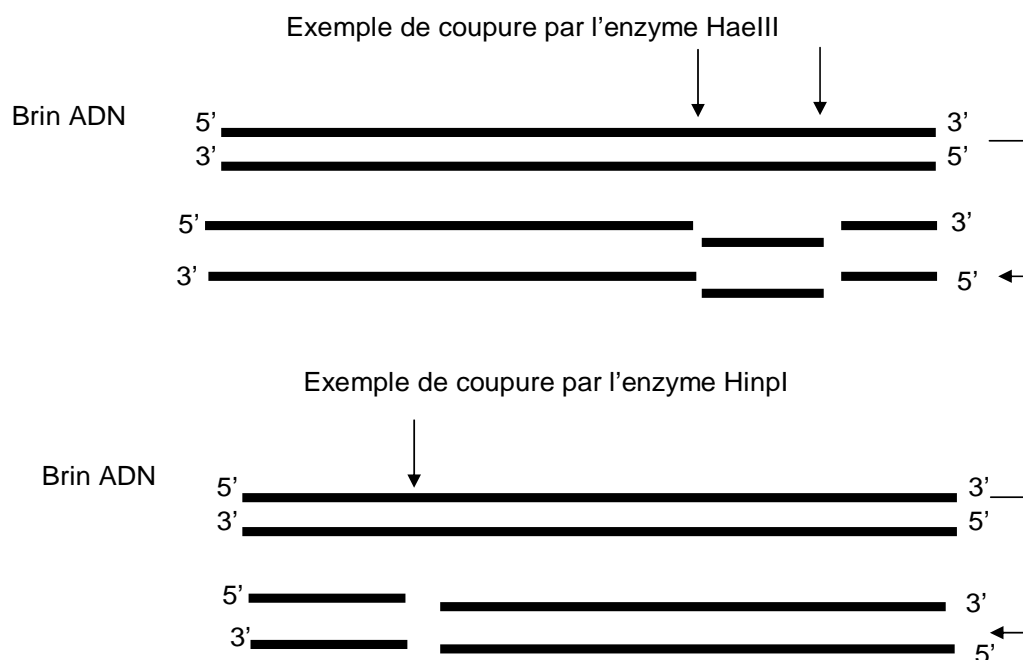


Figure 36 : Principe de la digestion par les enzymes de restriction.

Ces deux enzymes ont des sites de restriction spécifiques ce qui a permis d'obtenir des fragments de restriction de taille différente.

HinPI 5' - GC GC - 3'
 3' - CG CG - 5'

HaeIII 5' - GG CC - 3'
 3' - CC GG - 5'

L'ADN purifié a été mis en présence de 5 Unités d'enzyme de restriction et mis à incuber à 37°C pendant 2 heures. L'ADN ainsi digéré en fragments a été placé au congélateur à -20°C.

f) Séquençage

Les clones ont été amplifiés par une PCR dont la composition du mix est décrite dans le Tableau 15. Ils ont alors été purifiés grâce à un kit de purification GFXTM PCR DNA and Gel Band Purification de *Amersham Biosciences*. Les produits PCR purifiés ont alors subi une réaction de séquençage. La composition du mix destiné au séquençage est détaillée dans le Tableau 17.

Tableau 17 : Composition du mix PCR pour le séquençage

MIX PCR	x 1	x 12
Seq Buffer	3 µL	54 µL
BigDye	2 µL	36 µL
Amorce 8f	3,2 pmol (2,88µL)	
Eau	11,12 µL	249,12 µL
ProdPCR	1 µL	-

Ce mix subit alors plusieurs cycles thermiques détaillés dans le Tableau 18.

Tableau 18 : Cycles thermiques pour PCR du séquençage

Etapes	Température	Durée
1	94°C	30 s
2	52°C	5 s
4	60°C	4 min
5	Go to étape 1 39 fois	

II. Résultats de l'étude d'identification des microorganismes.

A. Extraction de l'ADN

La Figure 37 montre que l'ADN est présent dans le sédiment Z 4 1 analysé mais en très faible quantité. Pour les amplifications par PCR, 1 µL puis 5µL d'extrait ont été prélevés et amplifiés.

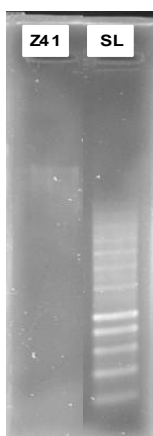


Figure 37 : Gel présentant l'ADN extrait dans le sédiment ainsi que dans les enrichissements (SL = Smart Ladder)

B. Analyse t-RFLP

Comme nous pouvons le constater sur la Figure 38, la digestion par l'enzyme Hae III permet de mettre en évidence la présence de deux populations de microorganismes dans tous les prélèvements. Ces deux populations sont caractérisées par les bandes de taille 72 et 112 paires de bases. Une population spécifique (bande à 36) est mise en évidence dans les échantillons 9.1, 9.2, 3.1 et 3.2 malgré une moindre intensité dans les zones 3.1 et 3.2. Ce constat permet de mettre en évidence une similitude entre les populations présentes dans les échantillons 9.2 et 3.1. Cela est confirmé par l'analyse statistique en Analyse à Composante Principale (logiciel Multi Variable Statistical Probability). Afin de faciliter l'analyse statistique, les échantillons ont été classés en deux groupes principaux, les échantillons de la zone 3 et 4 étant placés dans un groupe dit « très contaminé » et les échantillons de la zone 7 et 9 dans un groupe dit « moins contaminé ». Les couches 3.2 et 7.2 ont des populations diversifiées en regard des autres échantillons, en effet les couches 3.2 et 7.2 comportent 6 à 8 populations différentes. L'analyse statistique confirme que les groupes de couches 3.2, 7.2, 9.1 et 9.2 ont des profils éloignés du profil des échantillons 3.1, 4.1, 4.3, 7.1, 7.3.

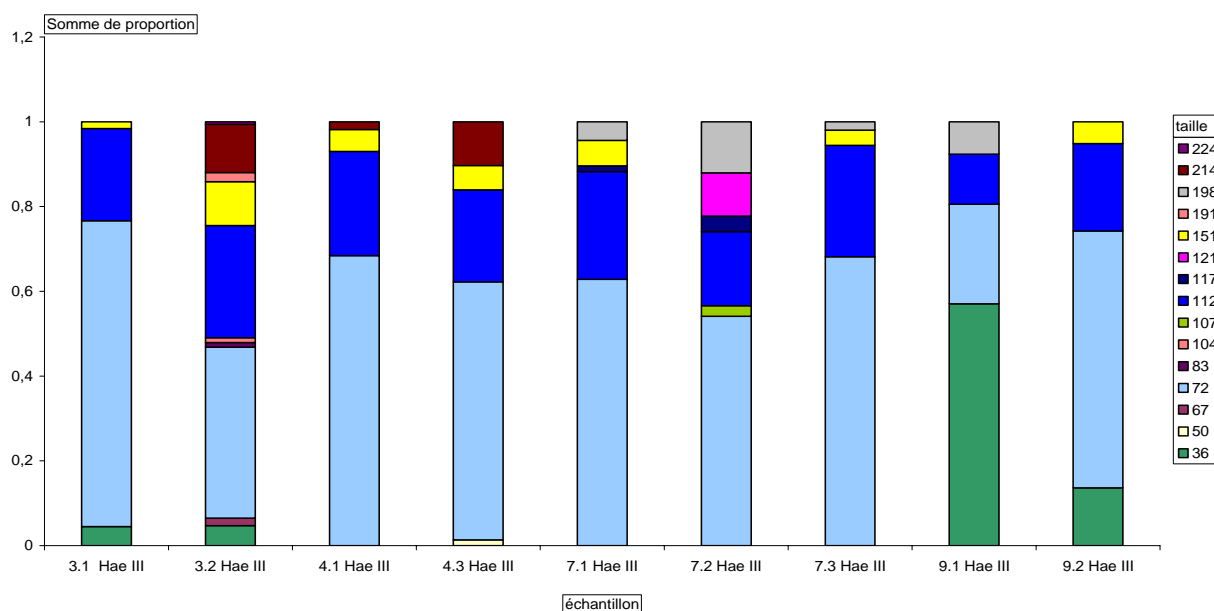


Figure 38 : Profil RFLP du brin d'ADN 5' des échantillons prélevés dans la lagune préalablement digérés par l'enzyme Hae III.

Le graphe de la Figure 39 montre les fragments obtenus en 5' après digestion par l'enzyme Hinp. Nous pouvons remarquer à nouveau la présence de deux populations communes à tous les échantillons soient les bandes à 72 et à 112 paires de bases. De plus une population originale est observée en 7.3 et 9.1 (bande à 202). Cette population est majoritaire dans la couche 9.1.

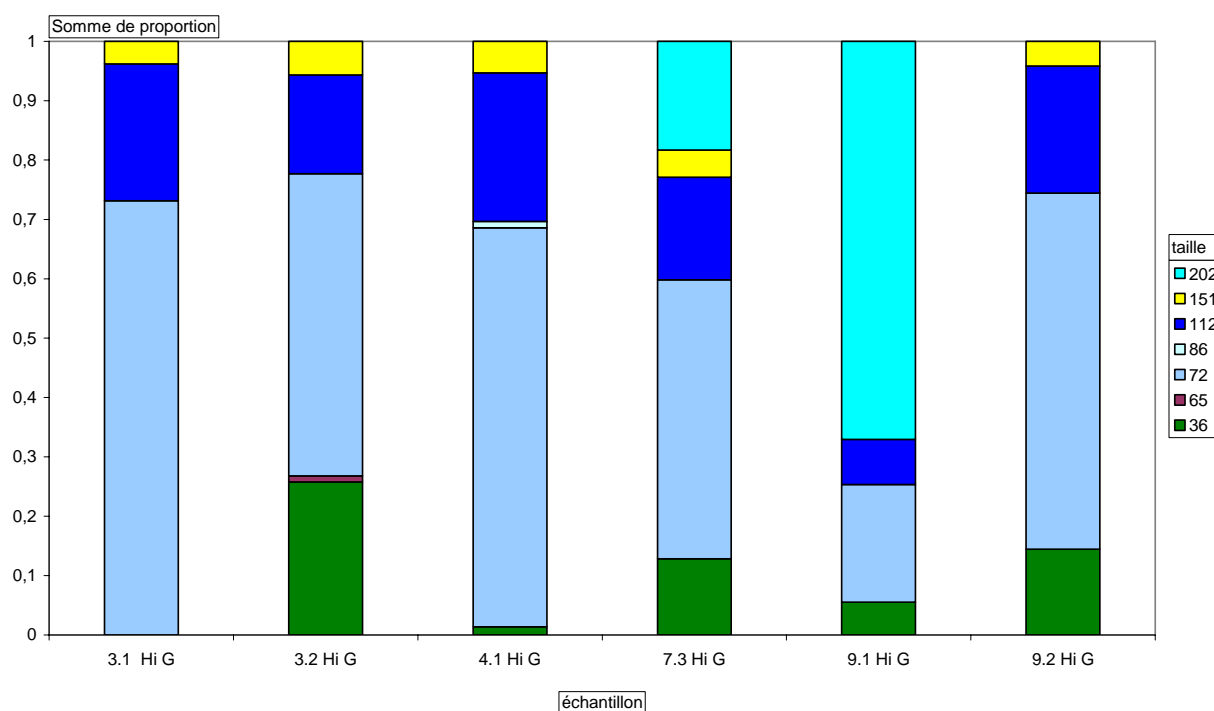


Figure 39 : Profil RFLP du brin d'ADN 5' des échantillons prélevés dans la lagune préalablement digérés par l'enzyme Hinp.

C. Séquençage génétique

Les fragments issus de la couche Z 4.1 ayant servi aux essais de bioremédiation ont été sélectionnés pour le séquençage.

a) Amplification :

Après amplification, les produits de PCR sont disposés sur un gel d'agarose afin de déterminer l'efficacité de la PCR. La Figure 40 montre que les échantillons ont été amplifiés.

Les produits de PCR : Z4.1 1 sont sélectionnés d'après la qualité de la bande sur le gel. Un spot lumineux et régulier témoigne d'une forte concentration en ADN et d'une bonne qualité de celui-ci.

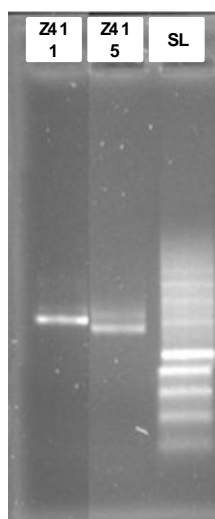


Figure 40 : Gel présentant l'amplification des échantillons destinés au séquençage

b) Purification

La Figure 41 montre le gel de contrôle réalisé suite à la purification des produits de PCR. L'ADN du sédiment (Z4 1) a été amplifié, et la concentration en ADN des produits PCR purifiés déterminée à l'aide d'une mesure optique à 50ng.L^{-1} .

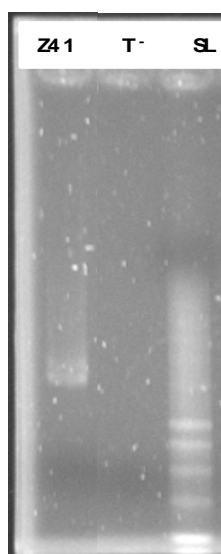
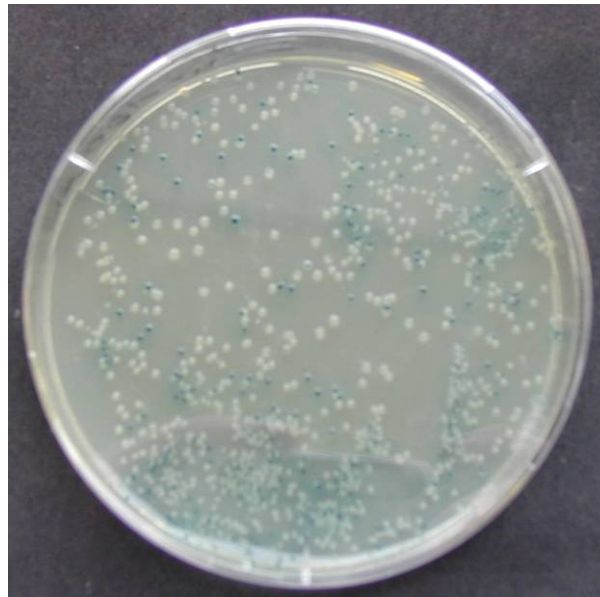


Figure 41 : Gel de contrôle après purification des produits de PCR non marqués.

c) Clonage

La Figure 42 montre les boîtes de Pétri obtenues après clonage des fragments issus de Z4. Les bactéries recombinantes restent donc blanches. Celles qui n'ont pas intégré l'insert virent au bleu. Quelque soit le volume étalé sur la boîte de Pétri, il y a beaucoup de recombinants. Nous avons donc sélectionné 94 clones à amplifier.

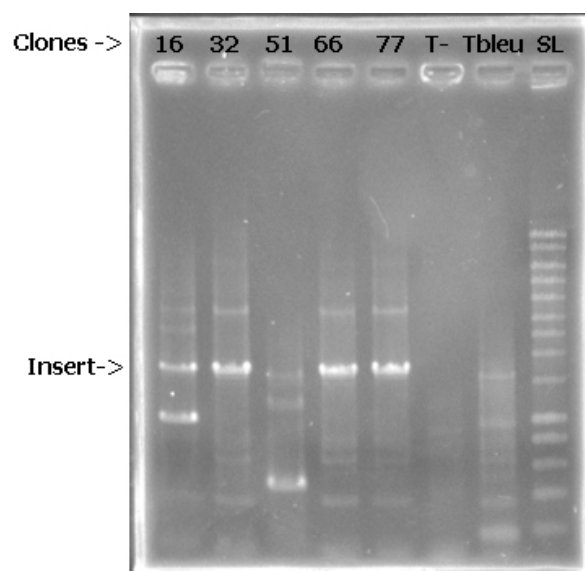


100 μ L Z4

Figure 42 : Résultats du clonage effectué sur Z4.

d) Amplification de l'insert

Des clones ont été sélectionnés aléatoirement pour les gels de vérification et sont présentés dans la Figure 43. L'insert de 1,5 kbp est bien amplifié dans la plupart des clones. Les clones Z4-16 et Z4-51 se sont révélés être de faux recombinants. En effet, leur colonie a viré au bleu (signe de non recombinaison) le jour suivant ce gel.



Z4

Figure 43 : Gels de contrôle après clonage effectué sur Z4.

e) Digestion enzymatique

Les profils de digestion sont présentés dans l'annexe III. On remarque que la biodiversité est bien plus importante dans le sédiment frais que dans l'enrichissement. Pour Z4, la diversité est telle que la plupart des profils n'ont qu'un seul représentant (clone). Le nombre de souches différentes est estimé entre 20 et 40 pour la couche Z4.1. Nous nous intéresserons par la suite aux profils ayant au minimum 2 représentants. On trouve alors 8 profils qui sont détaillés dans le Tableau 19.

Tableau 19 : Profils obtenus pour les clones issus de la couche Z4 1.

Profils	Clones, clones séquencés
A	19 , 35
B	86, 88
C	30, 59
D	20 , 62, 70
E	40 , 89
F	47, 74
G	21, 58 , 79
H	15, 17, 38, 65 , 87, 91

Les clones issus de cette digestion sont nommés par Z4 assigné d'un numéro correspondant à une des répétitions de digestion.

f) Séquençage

Les séquences des clones Z4-88, Z4-40, Z4-19, Z4-65, Z4-20, Z4-58, Z4-59, Z4-74 déterminées dans ce travail ont été soumises à la banque de gènes EMBL. Des numéros d'accès ont été assignés et sont présentés dans la Figure 44. Les séquences sont détaillées dans l'annexe IV.

Huit séquences ont été déterminées pour Z4, allant de 615 à 833 paires de bases. Ces séquences ont fait l'objet d'une étude comparative avec un logiciel BLAST utilisant des banques de données de séquences. Les résultats nous ont permis de dresser un arbre phylogénétique des souches présentes dans le sédiment. On estime à 2% de variabilité

génétique par rapport aux banques de données sur ce gène, la limite pour mettre en évidence une nouvelle souche. Le résultat de cette comparaison est présenté dans la Figure 44.

On observe une biodiversité importante dans la couche Z 4.1. En excluant le clone Z4-59, identifié comme étant *Pseudomonas gessardii*, les souches trouvées sont soit inédites (cas de Z4-20, Z4-40 et Z4-59) soit non cultivées (cas de Z4-88, Z4-19, Z4-65, Z4-58). Il y a 3 familles représentées, les *Geobacteriaceae*, les *Pseudomonaceae* et les *Clostridiceae*.

Suite aux expériences de séquençage des souches présentes dans le sédiment, des travaux ont été poursuivis afin de comparer les souches obtenues dans la boue (Z4) avec des souches répertoriées. Ainsi, il devient possible de construire un arbre phylogénétique permettant d'évaluer l'homologie entre les différentes souches. Le résultat de la construction phylogénétique est présenté dans la Figure 45.

<i>Clone</i>	<i>Correspondant le plus proche (n° accession)</i>	<i>Groupe Phylogénique (famille)</i>	<i>Identité Nucleotidique</i>	<i>Organisme le plus proche (n° accession, % homologie)</i>
Z4-88	Uncultured Bacterium clone 1013-1-CG26 (AY532547)	Geobacteraceae	98%	Desulfobulbus mediterraneus (AJ866934, 89%)
Z4-40	Uncultured Bacterium clone ga77 (DQ093940)	Geobacteraceae	94%	Uncultured Smithella sp. (AY607152, 94%)
Z4-19	Uncultured Bacterium clone BANW559 (DQ264528)	Pseudomonaceae	99%	Pseudomonas veronii (AY512622, 99%)
Z4-65	Uncultured Geobacter sp. clone HrhB73 (AM159288)	Geobacteraceae	97%	Geobacter psychrophilus (AY653551, 96%)
Z4-20	Uncultured Geobacter sp. clone KB-1 1 (AY780563)	Geobacteraceae	94%	Geobacter lovleyi (AY914177, 94%)
Z4-58	Uncultured Bacterium clone BANW664 (DQ264610)	Pseudomonaceae	99%	Pseudomonas veronii (AY512623, 99%)
Z4-59	Uncultured Bacterium HA16 (AF129865)	Clostridiaceae	96%	Catabacter hongkongensis (AY574991, 91 %)
Z4-74	Pseudomonas gessardii strain P25 (AY972182)	Pseudomonaceae	99%	Pseudomonas putida (AF094738, 99%)

Figure 44 : Comparaison des séquences des bactéries présentes dans le sédiment avec la banque de données Genbank à l'aide du moteur BLAST.

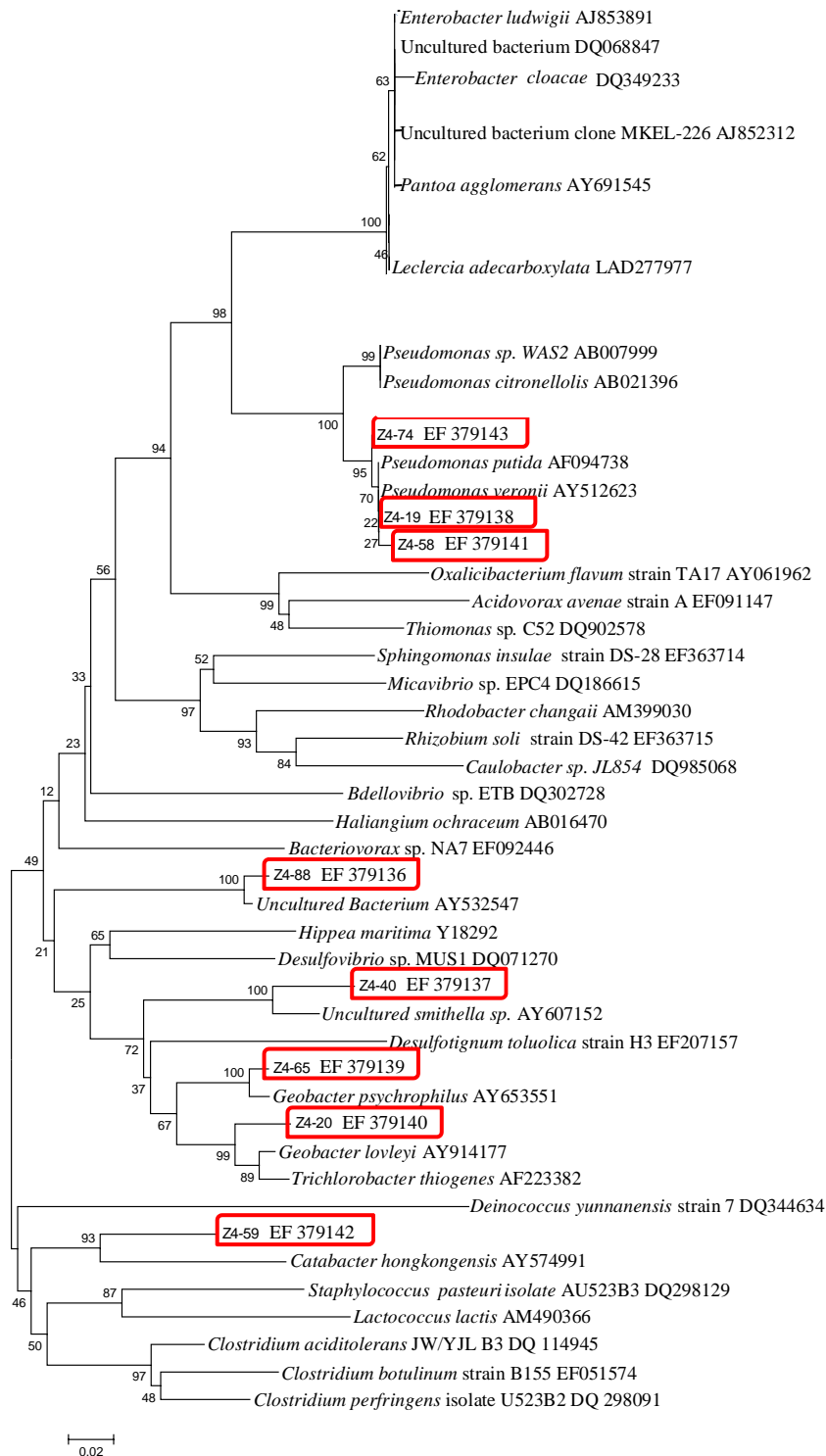


Figure 45 : Arbre phylogénétique des populations microbiennes présentes dans les échantillons Z4

Trois familles de bactéries sont dénombrées dans la couche Z4.1, les *Pseudomonaceae*, *Geobacteriaceae* et une *Clostridiaceae*. Les *Pseudomonaceae* sont des bactéries ubiquistes, aérobies, connues pour leurs capacités métaboliques et pour leur capacité

de biodégradation d'explosifs comme le TNT (Esteve-Nunez *et al.*, 2000). Les *Clostridiaceae* sont des anaérobies strictes très répandues dans l'environnement, ils sont impliqués dans la biodégradation des composés organiques et dans les processus fermentaires couplés à la production de biogaz. Les *Geobacteriaceae* (clones Z4-88, Z4-40, Z4-65, Z4-20) sont des microorganismes que l'on rencontre dans l'environnement et particulièrement dans les milieux saturés tels que les aquifères. Leur métabolisme est plutôt anaérobie. On leur attribue le pouvoir de coupler l'oxydation de composés aromatiques à la réduction d'oxydes métalliques (Lovley *et al.*, 1989 ; 1994). On les trouve également dans des cas de bioremédiation d'aquifères contaminés par de l'uranium (Vrionis *et al.*, 2005).

A l'exception de la séquence Z4-74 qui correspond à 99% à *Pseudomonas gessardii*, toutes les autres séquences se rapprochent génétiquement d'organismes non cultivés. Les clones Z4-40 et Z4-20 correspondraient à 2 nouvelles souches de *Geobacteriaceae*, car leur coefficient d'homologie n'excède pas 94%. De la même manière Z4-59 pourrait être considérée comme une nouvelle souche de *Clostridiaceae* (coefficient d'homologie : 96%). On peut s'interroger également sur la séquence Z4-65 dont le coefficient d'homologie de 97% est considéré comme limite pour suspecter une espèce nouvelle. Toutefois une mise en culture des deux souches et une comparaison par hybridation génome-génome avec les souches de plus forte homologie permettrait de confirmer cette hypothèse.

On remarque également que les clones Z4-88 et Z4-65 sont homologues à 98% et 97% avec des souches identifiées non cultivées. Si l'identification de nouvelles souches a largement progressé grâce aux techniques de biologie moléculaire (l'identification à partir du gène 16S), l'isolement des souches à croissance lente est mal maîtrisé de nos jours. Sur les 39 divisions que compte le règne bactérien, seulement 11 possèdent un représentant cultivé (Leadbetter, 2003). Des techniques sont aujourd'hui mises au point pour permettre la culture d'espèces à croissance lente (Ferrari *et al.*, 2005) mais ces techniques sont encore en développement.

Ces travaux ont fait l'objet d'une communication orale « Chemical and Microbial Characterisation of Industrial Sediment Contaminated With both Explosives and Herbicides » dans un colloque International « International Contaminated Site Remediation Conference - Contamination CleanUp 07 » à Adelaïde en juin 2007.

Ces travaux ont également fait l'objet d'une communication écrite présentée en annexe V.

Chapitre 4.

Essais de bioremédiation par fermentations en milieu liquide.

Comme nous avons pu le voir au cours de l'étude bibliographique, plusieurs procédés biologiques existent pour dépolluer un sol, dont le compostage. Ce dernier a été testé sur notre sédiment mais n'a pas permis d'observer une dégradation significative des composés organiques nitrés. En effet, les résultats ont montré clairement que dans nos conditions expérimentales, l'hexogène et l'octogène n'ont pas été dégradés au cours de la phase de compostage. Les conditions de compostage utilisées ne semblent donc pas appropriées pour orienter le métabolisme des microorganismes vers la consommation de l'hexogène et de l'octogène. De plus, les nitrophénols n'ont pas pu être identifiés, de nombreux produits étant co-extraits parasitant ainsi les chromatogrammes aux temps de rétention correspondant au Dinoseb et au Dinoterb.

De ce fait, une autre approche de bioremédiation par voie anaérobie a été adoptée. En effet, de nombreuses études ont montré que les nitramines et les nitrophénols pouvaient être dégradés dans ces conditions expérimentales (Garbi *et al.*, 2006 ; Halasz *et al.*, 2002 ; Adrian *et al.*, 2007 ; Boopathy, 2000 ; Vidali, 2001).

Au cours de la bioremédiation en milieu anaérobie, différentes stratégies peuvent être envisagées pour dégrader des composés nitrés. Des sources d'azote et ou de carbone peuvent être ou non apportées en fonction des conditions du milieu. Les molécules présentes dans la boue étant très riches en azote, nous avons choisi ne pas apporter d'azote supplémentaire aux bactéries afin de les contraindre à utiliser l'azote organique. Ainsi un milieu de Winogradsky, dépourvu d'azote peut permettre d'orienter le métabolisme des bactéries vers la consommation des produits nitrés.

De plus, il a été nécessaire d'apporter une source de carbone facilement assimilable, le glucose a été choisi et permettra de stimuler la croissance bactérienne.

Comme nous l'avons vu au cours du chapitre 2, un protocole de dosage des explosifs et des herbicides a été mis au point sur la fraction liquide du sédiment. Lors des essais de bioremédiation, le sédiment s'est progressivement délité, conduisant à l'épuisement de la fraction solide.

De plus, doser la fraction solide dans les essais de bioremédiation au cours d'une cinétique aurait obligé à mettre en place autant d'essais que de temps de prélèvements, ce qui aurait nécessité l'utilisation d'un grand nombre de réacteurs. En effet, il aurait été nécessaire de filtrer la totalité du contenu du système pour collecter toute la fraction solide à chaque temps de prélèvement. Par conséquent, nous avons dosé les composés dans la fraction liquide

celle-ci étant révélatrice du relargage progressif par la fraction solide des différentes molécules.

Dans ce travail, nous avons choisi deux séries d'essais, un destiné à travailler sur le sédiment et la flore endogène, l'autre à rechercher la présence de métabolites en travaillant sur des microorganismes isolés en présence de produit pur.

I. Essais de dégradation des composés présents dans le sédiment endogène

A. Mise en place de l'essai

a) Description et fonctionnement

Dix grammes de sédiment de la zone de surface la plus contaminée (zone 4.1) ajoutés à un litre de solution nutritive sont placés dans des erlenmeyers à vide de 2 litres. Ces essais ont été réalisés dans des conditions anaérobies à l'étuve à 40°C. L'état d'anaérobiose est assuré par un bullage d'azote dans le milieu durant 15 mn afin de chasser l'air du milieu de culture, les erlenmeyers étant ensuite fermés hermétiquement. Etant donné la pauvreté en éléments nutritifs dans le sédiment, la solution nutritive est composée d'oligo-éléments permettant la nutrition minérale des bactéries tout en nous permettant de contrôler l'apport azoté. Nous avons choisi le milieu minimal de Winogradsky dont la composition est détaillée dans le Tableau 20.

Tableau 20 : Composition du milieu de Winogradsky

Sels	Concentration
K₂HPO₄	5 g.L ⁻¹
MgSO₄	2,5 g.L ⁻¹
NaCl	2,5 g.L ⁻¹
FeSO₄	0,05 g.L ⁻¹
MnSO₄	0,05 g.L ⁻¹

b) Plan d'expérience

Ces expériences ont été menées dans des conditions anaérobies. Un témoin est réalisé en autoclavant le sédiment, ce traitement (AAT) stérilise la culture et permet d'observer l'évolution du sédiment en milieu liquide sans activité biologique. Ainsi deux conditions de bioremédiation sont utilisées. Une modalité consiste à mettre le sédiment en présence de glucose à une concentration de 5g/L (AA4). Une autre modalité consiste à renouveler cette même expérience en absence de glucose (AA1). Trois répétitions consistant en 3 erlenmeyers indépendants sont réalisées pour chaque traitement.

Des prélèvements de 50mL sont effectués à l'aide de piluliers de 100mL. Un premier prélèvement est effectué à $t=0$. Par la suite, des prélèvements seront réalisés tous les 15 jours à $t = 15$, $t = 30$ et $t = 45$ jours. Ces prélèvements sont faits sous agitation. Les conditions anaérobies sont rétablies immédiatement après le prélèvement par un nouveau bullage d'azote de 15 minutes. Les prélèvements sont immédiatement congelés à $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ pour analyse.

c) Paramètres suivis

1. Variation du pH

Le pH est suivi à l'aide d'une station pH mètre Denver Instruments. Les prélèvements sont préalablement filtrés. Le pH est alors mesuré sur le filtrat.

2. Dynamique des composés

Préalablement à l'extraction des composés organiques, 15 mL de tampon phosphate KH_2PO_4 5mM à pH 7,2 sont ajoutés à 15mL de filtrat. Les expériences présentant cet ajustement de pH sont expliquées en annexe VI. L'extraction est réalisée grâce à des cartouches de type SPE telle qu'elle a été décrite dans le chapitre 2. En raison des variations de concentrations entre les différents composés à $t=0$, les résultats sont exprimés en pourcentages de dégradation.

3. Bilan des populations microbiennes

Afin d'évaluer les microorganismes potentiellement impliqués dans la dégradation des composés nitrés, un bilan a été effectué sur le traitement ayant reçu du glucose. Le protocole d'extraction de l'ADN bactérien et les étapes aboutissant au séquençage sont identiques à ceux utilisés pour identifier les espèces présentes dans le sédiment de la lagune (voir chapitre 3).

B. Résultats

a) Variation du pH

Un suivi du pH a été effectué sur les milieux de fermentation au cours du temps. Comme le montre la Figure 46, le prélèvement effectué sur la zone 4 a un pH de 7,5, ce pH illustre les conditions dans lesquelles les bactéries évoluent au niveau de la surface de la lagune. De plus, nous pouvons constater que le témoin AAT autoclavé comme le traitement sans glucose AA1 conservent un pH constant au cours du temps. Cependant pour le fermenteur AA4 où le milieu comporte du glucose, on observe une acidification, le pH passant de 6,7 à 5,4. Cette acidification est typique du métabolisme fermentaire des bactéries en présence d'un substrat carboné comme le glucose. Cette fermentation s'accompagne d'une production d'acides. Ce résultat sera à prendre en compte dans la suite des expériences, le pH ayant une influence directe sur la solubilité des produits dans le milieu.

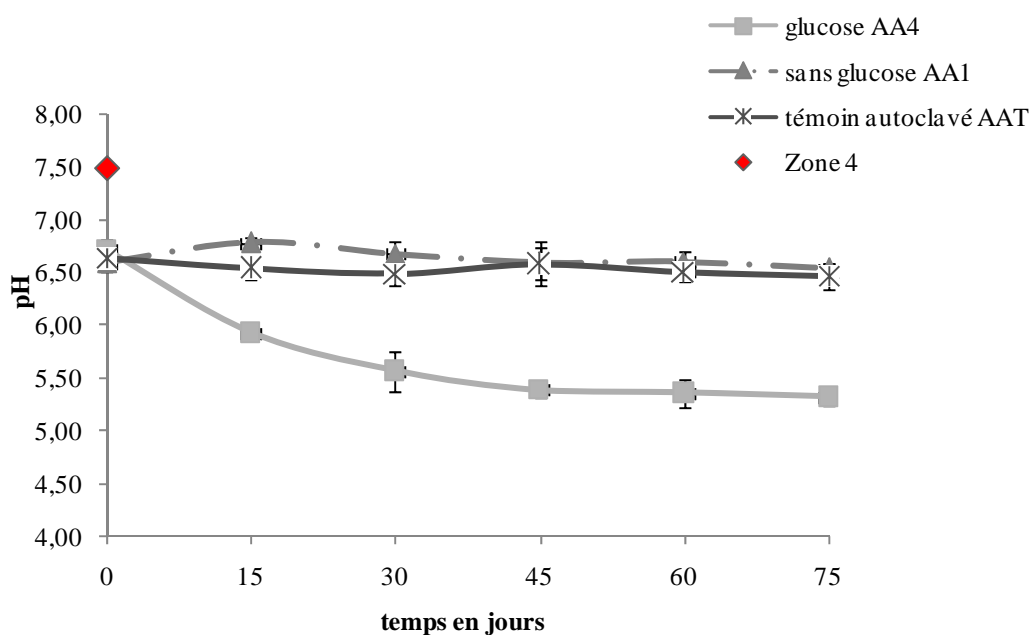


Figure 46 : Suivi du pH dans les fermentations en milieu liquide.

b) Variation des concentrations en contaminants

Aucune dégradation significative des herbicides n'a été observée dans le témoin autoclavé.

1. Les nitrophénols

La Figure 47 montre l'évolution du Dinoseb et du Dinoterb exprimé en pourcentage de

dégradation en présence ou en absence de glucose. Les résultats montrent qu'en absence de glucose, aucune dégradation des deux produits n'a eu lieu. Par contre, l'ajout de glucose a permis une disparition de 94,25% du Dinoseb et 97,3% du Dinoterb après 75 jours de culture.

Ces deux composés sont dégradés rapidement dans un premier temps, 80% de Dinoseb et de Dinoterb étant consommés en 30 jours. Une deuxième phase de dégradation plus lente a lieu entre 30 et 75 jours. Dans ces conditions de culture, aucun métabolite des herbicides n'a pu être observé en présence et en absence de glucose. Il a été reporté que le Dinoseb pouvait être dégradé en 20 jours avec un intermédiaire non identifié qui n'était pas modifié jusqu'à 200 jours (Roberts *et al.*, 1993). Le glucose utilisé comme un co-substrat a probablement favorisé la transformation des nitrophénols. En effet, la plupart des études sur les herbicides ont été menées en présence de co-substrats. Hammill et Crawford (1996) ont montré que *Clostridium* est capable de dégrader le Dinoseb dans des conditions anaérobies en présence d'une source de carbone supplémentaire.

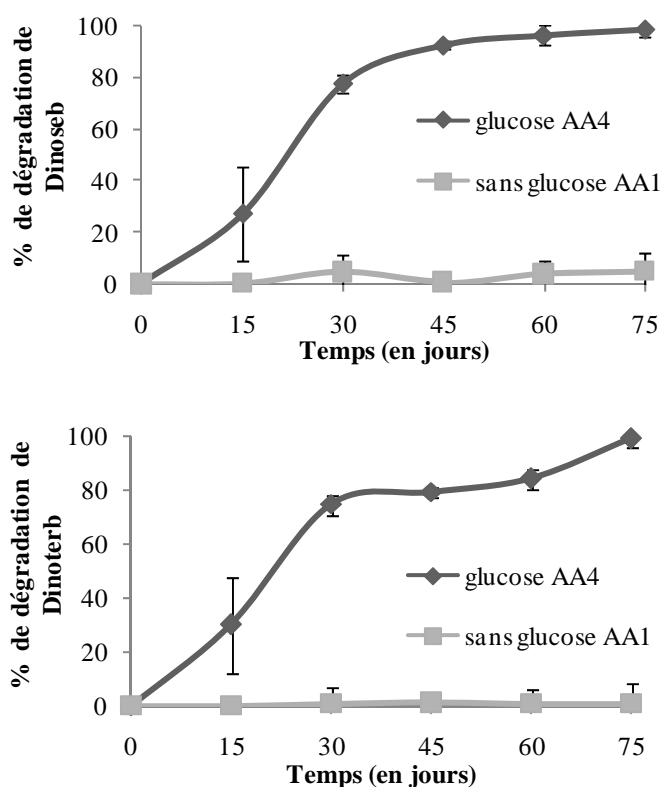


Figure 47 : Evolution de la concentration en herbicides sur 75 jours dans la fraction liquide des fermenteurs en présence (AA4) et en absence (AA1) de glucose après quantification par détecteur de masse.

2. Les nitramines

Concernant les explosifs, comme le montre la Figure 48, aucune dégradation de l'hexogène n'a pu être observée dans les conditions de fermentation réalisées. Aucune

dégradation significative des explosifs n'a été observée dans le témoin autoclavé. En revanche nous pouvons observer une légère dégradation de l'octogène en absence de glucose. Un métabolite a pu être observé après 15 jours de culture jusqu'à 75 jours (résultat non montré). L'hexogène et l'octogène ont des structures semblables, leur dégradation dépend de la présence d'accepteurs ou de donneurs d'électrons (Shen, 2000).

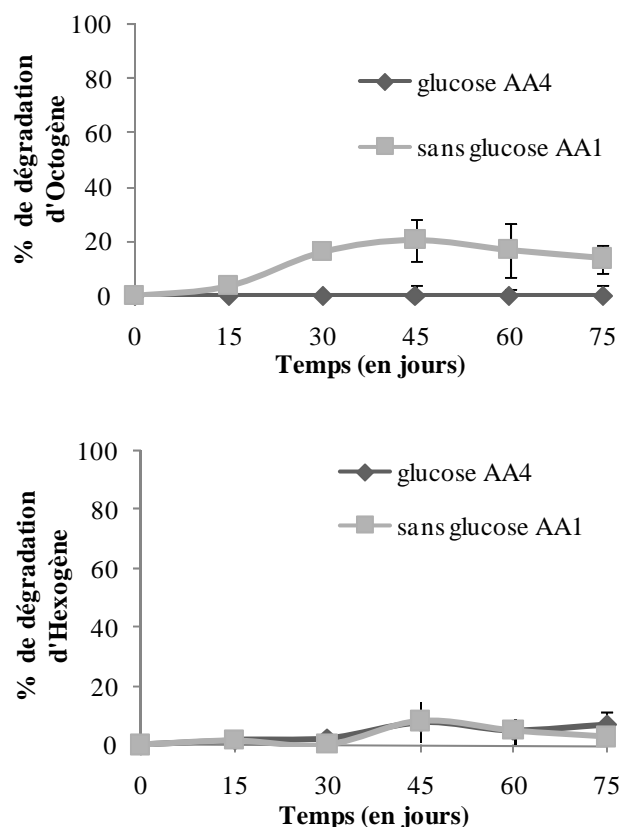


Figure 48 : Evolution de la concentration en explosifs sur 75 jours dans la fraction liquide des fermenteurs en présence (AA4) et en absence (AA1) de glucose après quantification par détecteur de masse.

Toutefois, la dégradation de l'octogène en absence de glucose suggère que cette transformation se déroule en absence de donneurs d'électrons. De plus, des études ont montré que l'hexogène est généralement plus facilement dégradé que l'octogène (Shen *et al*, 2000). Dans ces conditions, l'absence de dégradation de l'hexogène suggère un mécanisme inconnu pour la dégradation de l'octogène. On peut émettre l'hypothèse que certaines bactéries ont pu s'adapter au milieu et choisir préférentiellement l'octogène comme substrat sans nécessiter de source carbonée supplémentaire.

Toutes ces expériences ont montré des concentrations de départ en explosifs et en herbicides relativement faibles, comparées aux solubilités respectives des composés

organiques. Ces faibles concentrations peuvent être expliquées par la proximité de structure des molécules. En effet, les composés sont issus des mêmes familles, leur solubilité est ainsi considérablement diminuée en solution aqueuse.

c) Bilan des populations microbiennes

Les séquences des clones AA4 74, AA4 52, AA4 57, AA4 44, AA4 23, AA4 8, AA4 32, AA4 35 déterminées dans ce travail ont été soumises à la banque de gènes EMBL. Les numéros d'accès sont présentés dans la Figure 49. Les séquences des clones issus de l'enrichissement AA4 sont détaillées dans l'annexe IV.

Huit séquences ont été déterminées pour AA4, allant de 615 à 833 paires de bases. Comme pour les séquences de Z4, les séquences de l'enrichissement AA4 ont fait l'objet d'une étude comparative avec le logiciel BLAST. Les résultats nous permettent de dresser les arbres phylogénétiques des souches présentes dans le sédiment et dans son enrichissement AA4.

<i>Clone</i>	<i>clone le plus proche (n° accession)</i>	<i>Groupe Phylogénique (famille)</i>	<i>Identité Nucleotidique</i>	Organisme le plus proche (n° accession., % homologie)
AA4-74	Pseudomonas sp. WAS2 (AB007999)	Pseudomonaceae	99%	Pseudomonas citronellolis (AB021396, 99%)
AA4-52	Uncultured Bacterium clone PCF26 (AY540771)	Enterobacteraceae	100%	Leclercia adecarboxylata (LAD277977, 100%)
AA4-67	Uncultured Bacterium clone MKEL-226 (AJ852312)	Enterobacteraceae	100%	Enterobacter ludwigii (AJ853891, 99%)
AA4-44	Uncultured Bacterium clone PCF26 (AY540771)	Enterobacteraceae	99%	Leclercia adecarboxylata (LAD277977, 99%)
AA4-23	Uncultured Bacterium clone 5s8 (DQ068847)	Enterobacteraceae	99%	Pantoea agglomerans (AY691545, 99%)
AA4-8	Uncultured Bacterium clone 5s8 (DQ068847)	Enterobacteraceae	100%	Enterobacter ludwigii (AJ853891, 100%)
AA4-32	Pseudomonas sp. WAS2 (AB007999)	Pseudomonaceae	99%	Pseudomonas citronellolis (AB021396, 99%)
AA4-35	Uncultured Bacterium clone PCF26 (AY540771)	Enterobacteraceae	99%	Leclercia adecarboxylata (LAD277977, 99%)

Figure 49 : Comparaison des séquences des bactéries présentes dans l'enrichissement AA4 avec la banque de données Genbank à l'aide du moteur BLAST.

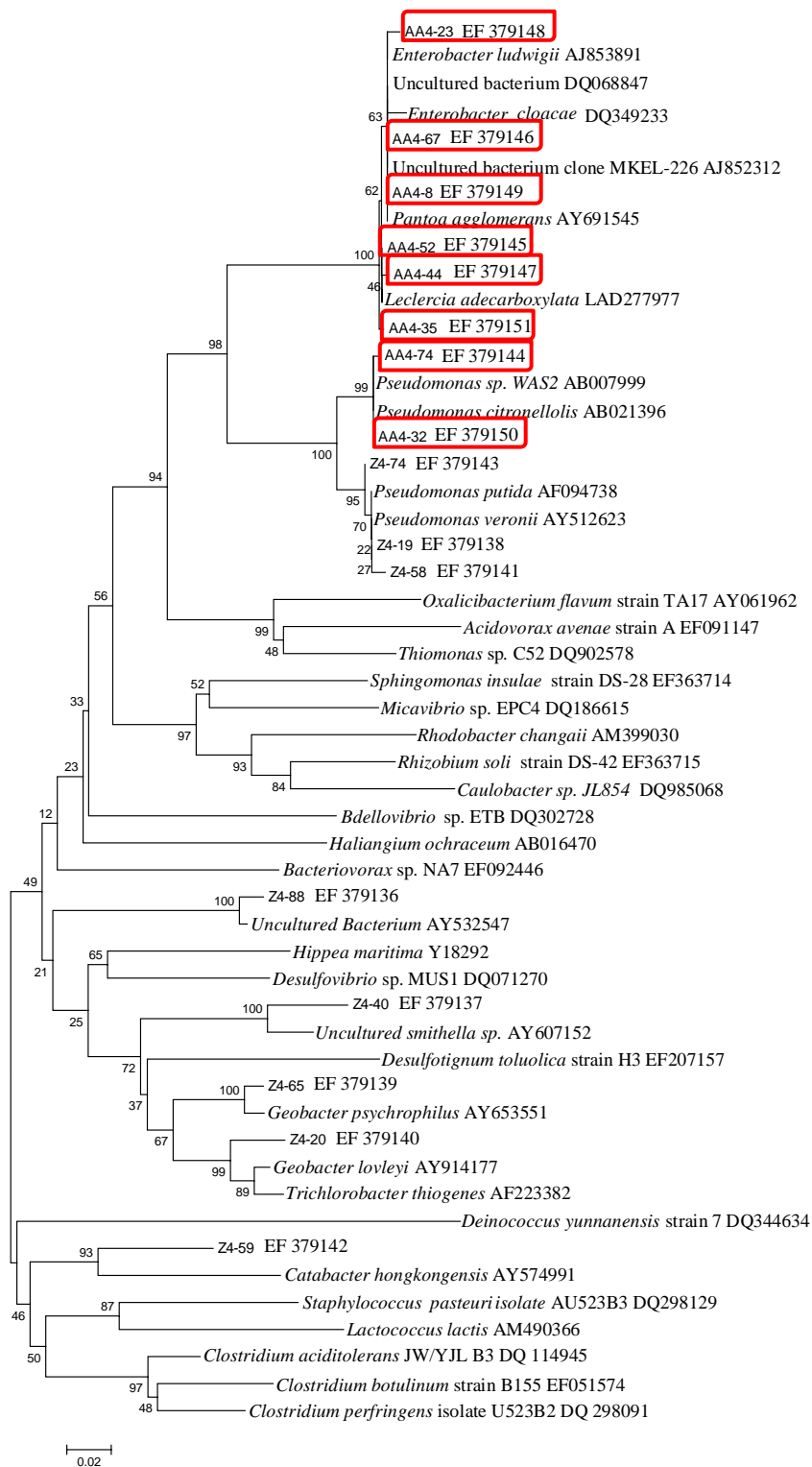


Figure 50 : Arbre phylogénétique des populations microbiennes présentes dans l'échantillon AA4.

L'analyse de la microflore dans le réacteur (AA4) permet de montrer que les conditions anaérobies et la présence de glucose sont à l'origine du développement d'une flore opportuniste essentiellement constituée de *Pseudomonaceae* tels que *Pseudomonas putida* et *Pseudomonas citronellolis*, d'*Enterobacteriaceae* (*Enterobacter Ludwigii*, *Enterobacter agglomerans*) et de *Leclercia adecarboxylata* (Figure 50). Le glucose ajouté au milieu de culture a certainement favorisé les souches à croissance rapide, au détriment des souches à croissance faible comme les *Clostridiaceae*. Dans ces conditions anaérobies, une bactérie domine la microflore, *Leclercia adecarboxylata* (clones AA4-52, AA4-44, AA4-35). Cette bactérie, décrite par Richard en 1989, est capable de dégrader des hydrocarbures aromatiques polycycliques (Sarma *et al.*, 2004). L'analyse de la boue n'a pas permis de mettre en évidence la présence d'hydrocarbure. Toutefois, rien dans la littérature ne permet de savoir si cette bactérie a un rôle dans la dégradation des nitrophénols ou si elle s'est développée par la suite, utilisant les produits cycliques issus de la dégradation des composés nitrés.

Pseudomonas citronellolis a aussi été décrite pour son potentiel de dégradation des HAP (Jacques *et al.*, 2005). Cette souche possède 99% d'homologie avec notre clone AA4-74. Il a été montré que plusieurs espèces de *Pseudomonas* sont capables d'utiliser le nitrate comme accepteur final d'électrons dans la chaîne respiratoire (Spangler et Gilmour, 1965; Hernandez et Rowe, 1987). Le fait de trouver *Pseudomonas* en condition anaérobie indiquerait la présence de nitrate dans l'enrichissement AA4. Or, le sédiment Z4 est très pauvre en azote inorganique et le milieu de Winogradsky est totalement dépourvu de nitrate ou de nitrite. La seule source d'azote réductible provient des groupements nitrés des contaminants organiques. De plus, *Pseudomonas putida* a été récemment décrit pour dégrader le *p*-nitrophenol (Kulkarni et Chaudhari, 2006). Dans cette étude, les auteurs montrent que l'ajout de différentes sources d'azote dans le milieu de culture ne perturbe pas la consommation du *p*-nitrophenol. En revanche l'ajout de glucose (0,4 g.L⁻¹) l'inhibe. En 40h, la baisse de la concentration en *p*-nitrophenol est de 300 ppm sans glucose et de 60 ppm avec glucose. Ces résultats suggèrent que *Pseudomonas putida* utilise le *p*-nitrophenol comme source d'énergie, de carbone et d'azote. Cette souche est également capable de dégrader d'autres composés phénoliques non-azotés tels que le 2-chlorophénol (Farell et Quilty, 2001). De même, *Pseudomonas veronii*, est capable de métaboliser des composés phénoliques non azotés tels que le 4-amylphenol, le 4 hexylphenol et le pentachlorophénol (Nam *et al.*, 2003; Ajithkumar *et al.*, 2002). Ces résultats suggèrent également que des souches de *Pseudomonas* sont capables d'utiliser le cycle phénolique comme source d'énergie et de carbone. Il est possible d'imaginer un scénario de biodégradation où les composés seraient d'abord dénitrifiés, les nitrates ainsi relargués seraient utilisés comme accepteur final d'électron dans la

chaîne respiratoire où l'énergie proviendrait de l'hydrolyse du cycle phénolique. Ces résultats pourraient expliquer l'absence de métabolites décrits dans plusieurs études.

Dans le consortium des bactéries présentes dans le fermenteur, nous avons pu noter la présence d'*Enterobacter agglomerans*, germe très proche de *Pantoea agglomerans* (clones AA4-23), qui possède une azoreductase et est capable de dégrader les doubles liaisons N=N comme les colorants azo (Moutaouakkil *et al.*, 2003). Toutefois, rien n'a été rapporté en ce qui concerne une action sur les composés nitrés. Elle est décrite comme biodégradable des LAS (linear alkylbenzene sulfonate) qui possèdent un cycle benzène (Khleifat, 2006). La complexité de la boue n'exclue pas les phénomènes de condensation des molécules dans les effluents, ce qui expliquerait la présence de bactéries telles que *Leclercia adecarboxylata* et *Pantoea agglomerans*, capables de métaboliser des composés polycycliques.

Il est important de souligner que cette composition de la microflore n'est qu'une image statique de l'écologie bactérienne après 75j de culture. Or nous avons vu que 75% de la consommation se faisaient durant les 30 premiers jours. Il nous est donc difficile de conclure sur le rôle précis de ces bactéries dans la bioremédiation avérée des deux composés nitrophénoliques, Dinoseb et Dinoterb.

L'étude de fermentation en milieu liquide nous a permis de mettre en évidence plusieurs souches (notamment *Leclercia adecarboxylata*, *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas citronellolis*) potentiellement capables de dégrader les herbicides. De plus, de nombreux travaux font état du potentiel de ces bactéries à métaboliser des produits de familles proches des dinitrophénols. Sur ces bases, il devient possible de tester les souches isolées avec un herbicide pur, afin d'identifier le réel potentiel des bactéries à dégrader les dinitrophénols et de rechercher la présence éventuelle de métabolites.

II. Essais de dégradation du Dinoterb sur souches pures

L'arbre phylogénétique précédemment décrit combiné à une recherche bibliographique tournée vers les souches bactériennes répertoriées pour avoir un potentiel de dégradation de composés nitrés nous ont amené à nous procurer des souches nous permettant de réaliser des tests sur lignée pure. Nous avons donc testé le potentiel des bactéries *Leclercia adecarboxylata*, *Pseudomonas citronellolis* et *Pseudomonas putida*, identifiées dans le sédiment de la zone 4.1 mais également reportées dans la littérature pour dégrader le *p*-nitrophénol de la même famille que le Dinoterb et le Dinoseb. Nous avons suivi l'action de ces bactéries sur le Dinoterb seul.

Cette expérience avait aussi pour objectif d'identifier de possibles métabolites issus de la dégradation du Dinoterb.

A. Mise en place de l'essai

a) Description et fonctionnement

Deux espèces de *Pseudomonas* (*putida* et *citronellolis*) ainsi qu'une espèce de *Leclercia* (*adecarboxylata*) provenant de l'institut Pasteur (Paris) ont été mises en culture dans des tubes en verre de 10 mL contenant des milieux nutritifs spécifiques adaptés :

- *Pseudomonas putida* : milieu Trypto casein soy agar 39 g.L⁻¹ (milieu 72), Oxoid.
- *Pseudomonas citronellolis* et *Leclercia adecarboxylata* : milieu Columbia agar 39 g.L⁻¹ (milieu 3), Oxoid.

Ces souches ont ensuite été repiquées régulièrement pendant 3 semaines. Une phase d'acclimatation des souches a alors été appliquée par repiquage en milieu stérile, en fioles de 30mL en verre serties avec un septum en caoutchouc pour les expériences anaérobies et bouchées avec du coton cardé pour les expériences menées en aérobiose. L'anaérobiose est créée en faisant buller de l'azote dans le milieu à l'aide d'une aiguille durant 5mn.

b) Plan d'expérience

Dans les expériences décrites ci dessous, les milieux de culture utilisés pour les repiquages sont remplacés par des milieux nutritifs simplifiés (solutions de Winogradsky). Chaque espèce de microorganisme, *Pseudomonas putida* et *Pseudomonas citronellolis* ainsi que *Leclercia (adecarboxylata)* sont exposés aux conditions suivantes. Des fioles de 30mL inoculées par 100μL de culture (DO initiale 0.01) ont été utilisées pour exposer les souches à des quantités fixées de Dinoterb (1,5 mg.L⁻¹) en conditions aérobies et anaérobies avec et sans glucose (5 g.L⁻¹) dans un milieu de Winogradsky (composition décrite en début de chapitre). Une dernière condition témoin a été réalisée sans inoculer de bactérie. Chaque condition a été réalisée en triplicat, des prélèvements ont été effectués à t=0, 24, 48, 72 et 120h. Pour les expériences menées en anaérobiose, après chaque prélèvement les conditions d'anaérobiose ont été restaurées par un flux d'azote de 5 mn comme il a été décrit précédemment.

c) Paramètres suivis

1. Croissance bactérienne

La croissance bactérienne a été suivie sur les essais en anaérobiose en mesurant la Densité Optique (DO) à t=0, 24h, 48h, 72h, et 120h à l'aide d'un spectrophotomètre Biomate 3 (Thermo Spectronic) à $\lambda = 600\text{nm}$.

2. Dégradation du Dinoterb

L'évolution de la concentration en Dinoterb a été suivie à T= 0 et T=120 heures après extraction par SPE et dosage en HPLC-MS (décrite dans le chapitre mise au point de protocole analytique).

B. Résultats

En condition aérobie, nous n'avons pu observer aucune dégradation du Dinoterb après 5 jours de culture en présence ou en absence de glucose (résultats non montrés).

Les résultats qui vont être présentés dans la suite de ce chapitre ont été réalisés en anaérobiose en présence et en absence de glucose.

a) Dynamique des populations

L'analyse de la croissance bactérienne, montre (Figure 10) que les souches de *Leclercia adecarboxylata*, *Pseudomonas citronellolis*, et *Pseudomonas putida* peuvent croître dans le milieu de culture en présence de Dinoterb. Nous pouvons remarquer que ces trois souches se développent plus rapidement en présence qu'en absence de glucose où l'on observe au bout de 120h un doublement de la population bactérienne. En présence de glucose, *Pseudomonas citronellolis* et *Leclercia adecarboxylata* ont une première phase de croissance rapide les premières 20h. Dans un second temps *Pseudomonas citronellolis* continue de croître mais avec une vitesse plus lente tandis que *Leclercia adecarboxylata* ralentit sa croissance et tend vers un plateau à 60h. *Pseudomonas putida* adopte une croissance plus lente mais constante sur 5 jours. En 5 jours, les trois souches ne consomment que 50% du glucose initial, (résultats non montrés) ce qui montre que la source de carbone n'a pas joué le rôle de facteur limitant pour la croissance des microorganismes.

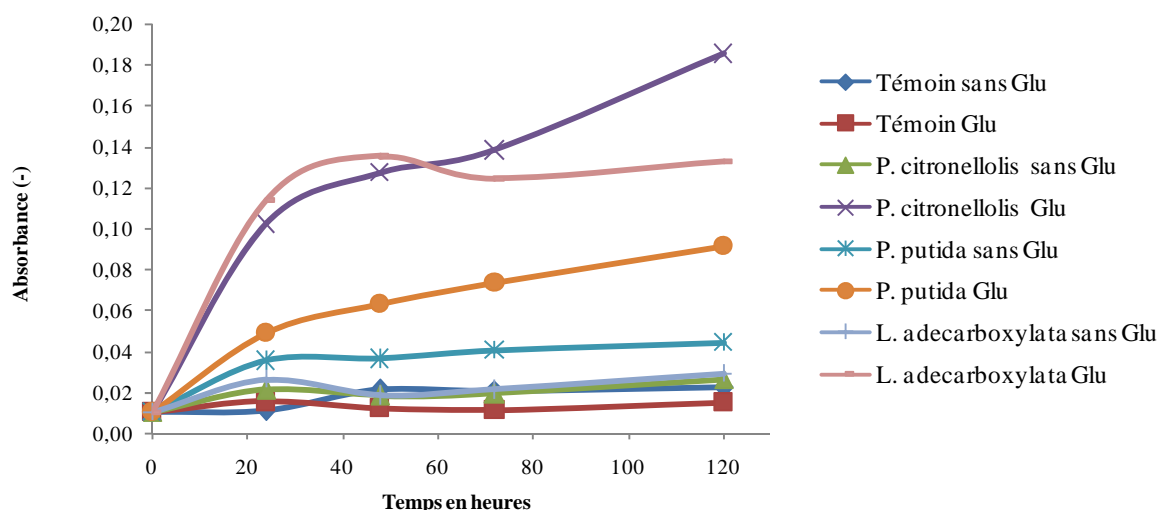


Figure 51 : Cinétique de croissance bactérienne par suivi de la DO600

b) Dégradation du Dinoterb en fonction des souches

En anaérobiose, les résultats de la Figure 52 montrent une activité nette de dégradation du Dinoterb en présence de glucose pour *Leclercia adecarboxylata*, *Pseudomonas putida* et *Pseudomonas citronnellolis*. La concentration en Dinoterb à $t=0$ ($1,5\mu\text{g.mL}^{-1}$) diminue de 82% en 5 jours avec *Pseudomonas citronnellolis* et de 60% avec *Leclercia adecarboxylata* et *Pseudomonas putida*. En absence de glucose, seuls les *Pseudomonas* sont capables de transformer le Dinoterb avec une différence significative entre *Pseudomonas putida* (26,3%) et *Pseudomonas citronnellolis* (47,6%).

Bien que *Pseudomonas citronnellolis* soit capable de consommer 47,6% de Dinoterb en absence de glucose avec seulement 10 % de croissance, cette espèce peut dégrader 82% du Dinoterb en présence de glucose avec une croissance dix fois supérieure.

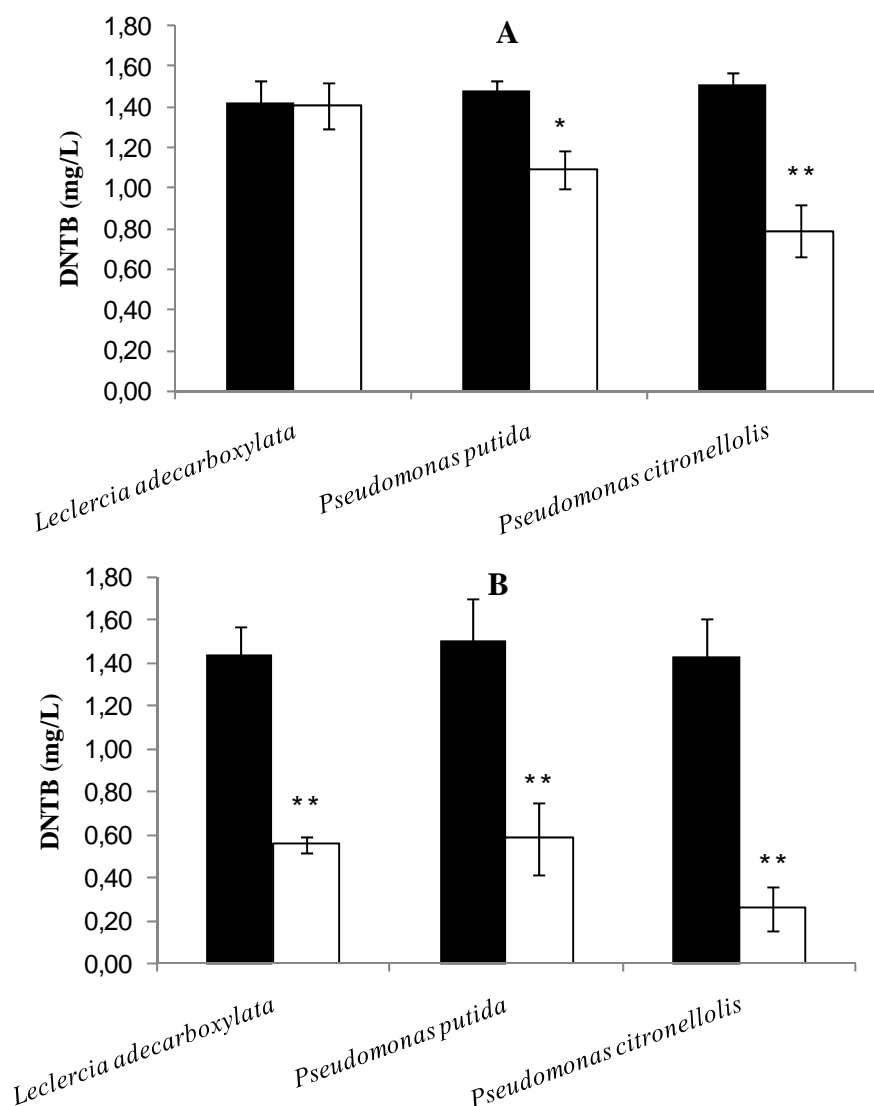


Figure 52 : Tests de biodégradation en présence (A) et en absence (B) de glucose. L'étude de la dégradation du Dinoterb a été réalisée entre 0 (■) et 5 (□) jours de culture. Les marques * et ** représentent des valeurs significatives $p < 0,01$ et $p < 0,05$ respectivement au test de Tukey.

Le rapport entre la densité optique à 600 nm et la concentration en DNTB à 120h est montré par la Figure 53. Les résultats confirment que le glucose joue un rôle important dans le métabolisme du Dinoterb par les trois bactéries. De plus, nous pouvons remarquer que *Pseudomonas citronellolis* est l'espèce qui dégrade le plus de DNTB. L'efficacité de dégradation des souches peut donc être définie par *Leclercia adecarboxylata* < *Pseudomonas putida* < *Pseudomonas citronellolis*.

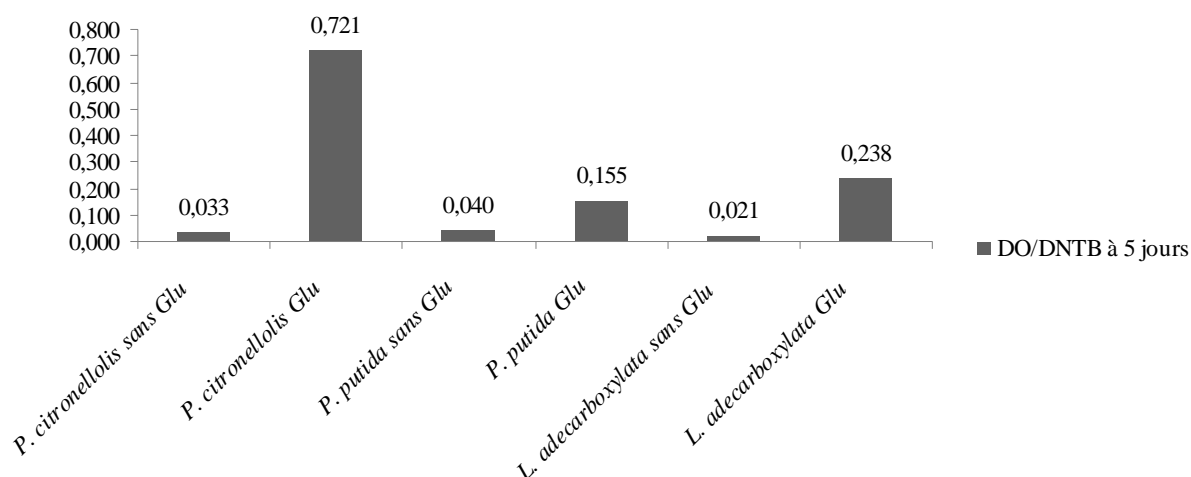


Figure 53 : Rapport DO/DNTB au temps 5 jours

Ces résultats impliquent significativement les genres *Pseudomonas* et *Leclercia* et plus particulièrement le potentiel de *Pseudomonas citronellolis* dans la dégradation des composés nitrophénoliques. Aucun métabolite du Dinoterb n'a pu être mis en évidence au cours de cette expérience. Les études sur le Dinoterb sont rares, en revanche des tests mettant en présence *Pseudomonas* sp avec du TNT ont révélé que 85% de l'azote total des composés nitroaromatiques étaient incorporés dans la biomasse (Esteve Nunez *et al.*, 2000). Des essais utilisant du TNT marqué au [^{14}C] ont montré que seulement 1% de la radioactivité était retrouvée sous forme de $^{14}\text{CO}_2$ mais 45% était associée à une fraction de cellules précipitées par de l'acide trichloroacétique. Ces recherches nous amènent à penser que le Dinoterb est incorporé dans les cellules.

Ces travaux ont été publiés dans le journal International Biodeterioration and Biodegradation : « Microbial population changes during bioremediation of nitroaromatic- and nitramine-contaminated lagoon » en 2007 (sous presse). (voir annexe VII)

Chapitre 5.

Réacteurs mixtes en conditions aéro-anaérobie.

Les expériences précédentes de bioremédiation en milieu liquide nous ont permis de montrer que les nitrophénols ne sont consommés qu'en conditions anaérobies. Dans les mêmes conditions, l'hexogène et l'octogène ne sont pas dégradés. Ces conditions sont à l'heure actuelle largement utilisées pour traiter un grand nombre de rejets (effluents et déchets) dans divers domaines, industriels, municipaux, et agricoles. En effet, la digestion anaérobie peut conduire à la minéralisation de la matière organique et à la production de biogaz, composé principalement de méthane et de gaz carbonique. Cette digestion est réalisée en anaérobiose par une communauté microbienne complexe. De manière générale, la digestion anaérobie s'applique à la matière organique d'origine naturelle (non ligneuse) ou chimique (hors polymères plastiques, résines...). Pour traiter efficacement ces rejets ou déchets, plusieurs procédés peuvent être utilisés, mais ils visent à maintenir la biomasse bactérienne fonctionnelle dans les digesteurs (par fixation, recyclage ou autre).

En suivant ce principe, le réacteur que nous avons utilisé est dérivé du type Digesteur hybride (C) décrit sur la Figure 54 (Moletta, 2005).

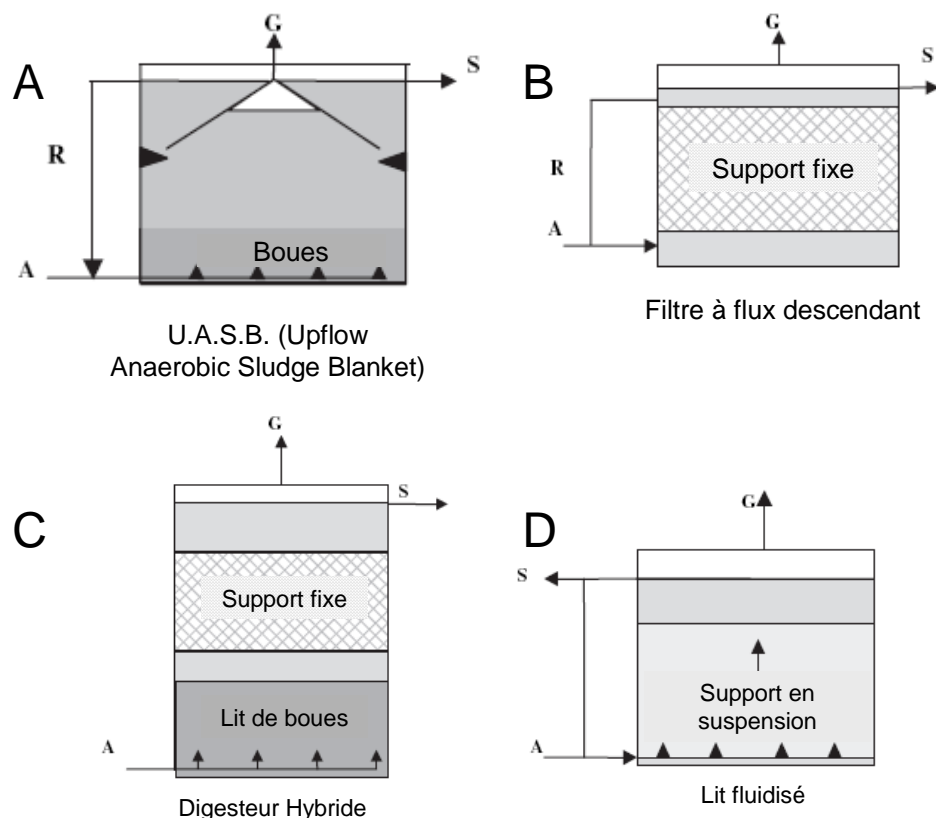


Figure 54 : Procédés non agricoles destinés à la production de biogaz (d'après Moletta, 2005). A : arrivée d'effluent à traiter ; S : sortie de l'effluent traité ; G : récupération du biogaz ; R : recyclage.

Si plusieurs études font état de la dégradation des nitramines par certains microorganismes en anaérobiose, cette dégradation n'a pas eu lieu dans nos conditions. De nombreux travaux montrent la dégradation des nitramines par des microorganismes en aérobiose (Fernando et Aust, 1991 ; Sublette et al, 1992 ; Binks et al, 1995).

Nous avons donc du adapter le format du réacteur à notre expérience. En vue de pouvoir dégrader les composés nitrophénoliques et les nitramines, il a été nécessaire d'ajouter une phase aérobie dans le procédé. Nous avons mis en place un système dit de « cascade » en sortie du fermenteur. Lors de son passage de la colonne au bac collecteur, l'effluent subit une chute à l'air libre de plusieurs centimètres. Il y a alors un brassage avec l'air ambiant et oxygénation de l'effluent. Pour accroître l'aération, le volume de liquide dans ce bac est volontairement réduit.

A. Descriptif et fonctionnement du système

Comme le montre la Figure 55, le réacteur est constitué d'un cylindre en PVC gris de 375mm de haut et d'un diamètre de 40mm. Les conditions à l'intérieur du réacteur sont donc en anaérobiose. Un trou est percé à la base du réacteur permettant d'effectuer une liaison avec le réservoir 1. Les deux réservoirs sont des bacs de 50 cm de haut pour un diamètre de 35 cm. La base du réacteur étant située en dessous du niveau du réservoir 1, la circulation du milieu depuis le réservoir 1 vers le réacteur se fait par gravité. De même, la partie supérieure du réacteur est reliée à un deuxième réservoir par un tuyau laissé volontairement à plusieurs centimètres au dessus de la surface du liquide afin d'assurer un maximum d'aération. Le milieu est remonté du réservoir 2 vers le réservoir 1 par l'intermédiaire d'une pompe d'aquarium (Maxi Jet 250, Aquarium systems) à un débit de 150mL.mn^{-1} . Des pièces d'assemblage d'arrosage et de plomberie PVC sont utilisées pour effectuer les raccords entre les différents compartiments. Nous avons donc mis en place un dispositif pilote d'environ 200 mL de volume utile. Les paramètres de fonctionnement du système sont les suivants :

- Volumes de stockage amont et aval : 50L
- Volume utile de la colonne : 200mL
- Volume total de solution nutritive : 30L
- Masse de sédiment traité : 30g

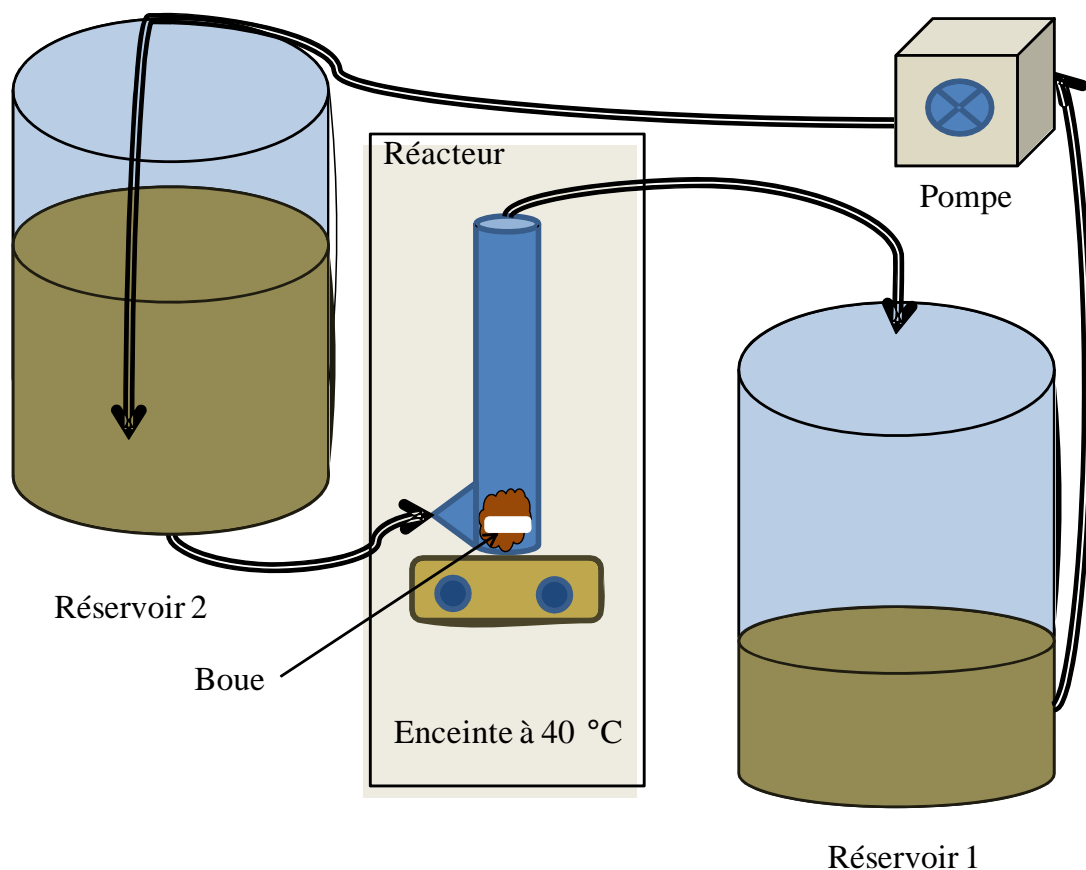


Figure 55 : Schéma du dispositif pilote

- Composition du milieu nutritif

Nous avons choisi de diluer le sédiment dans ce milieu à hauteur de 1g par litre.

Pour la source de carbone facilement assimilable, nous avons choisi l'amidon à une concentration de 5 g.L^{-1} . Si le glucose est plus facilement assimilable, son coût pour une utilisation à l'échelle industrielle est bien plus élevé que celui de l'amidon.

B. Plan d'expérience

Trois réacteurs tels qu'il a été décrit plus haut ont été mis en place. Des prélèvements de 100mL sont effectués régulièrement dans le compartiment aérobie à l'aide de piluliers de 250 mL. Ces prélèvements ont été effectués à $t = 0, 1, 3, 8, 17, 35, 45, 58,78$ et 105 jours. Ces prélèvements serviront à effectuer différentes mesures décrites ci dessous.

C. Paramètres étudiés

a) Suivi du pH

Le pH est suivi à l'aide d'une station pH mètre Denver Instruments. Les prélèvements sont préalablement filtrés. Le pH est alors mesuré sur le filtrat.

b) Cinétique de disparition des herbicides et des explosifs

Préalablement à l'extraction des composés organiques, 15 mL de tampon phosphate KH_2PO_4 5mM à pH 7,2 sont ajoutés à 15mL de filtrat. L'extraction est réalisée grâce à des cartouches de type SPE tel qu'il a été décrit dans le chapitre 2.

c) Suivi des anions

La phase minérale est récupérée lors de l'extraction des composés organiques. En effet lors de l'extraction par SPE, la phase minérale est éluée de la cartouche alors que les composés d'intérêt sont fixés sur la colonne. Cette phase minérale a été conservée en vue du dosage des ions. Un volume de 1mL de phase minérale est placé dans un pilulier. Le dosage des anions a été effectué grâce à une chromatographie ionique « Ion chromatography system, DIONEX ICS 100 ». Ainsi la SPE aura permis de séparer efficacement les fractions minérales et organiques qui pourront être dosées.

d) Suivi des populations grâce au FISH (Fluorescent in situ hybridization)

Le FISH est une méthode destinée à repérer la présence de molécules cibles par un système de fluorophores portés par de courtes séquences d'ADN (Moter et Gobel, 2000 ; Jang *et al.*, 2005). Dans le cas qui nous intéresse, cette méthode permet d'étudier des cellules entières (les bactéries) en utilisant des sondes oligonucléotidiques dirigées sur l'ARN 16s (identité spécifique des bactéries).

Rappel :

Les ribosomes sont formés de deux sous-unités comportant chacune des protéines ribosomales assemblées sur une matrice d'acides ribonucléiques (ARNr). Les ARN ribosomiques (soit de la petite sous unité: ARNr 16S, soit de la grande sous-unité du ribosome: ARNr 23S) se sont imposés comme référence de taxonomie moléculaire.

Cette méthode a été développée dans le but de suivre l'évolution au cours du temps des espèces de bactéries susceptibles de dégrader les composés d'intérêt. Les sondes ont été

conçues pour cibler spécifiquement certaines séquences majoritaires retrouvées lors de l'identification des microorganismes bactériens présents dans les sédiments de la lagune.

Grâce au FISH, l'identité phylogénétique, la morphologie, le nombre et l'arrangement spatial des microorganismes dans un environnement donné peuvent être évalués.

Les sondes sont marquées par un fluorochrome à leur extrémité 5'. Deux types de fluorochromes sont ainsi utilisés. Le fluorochrome Cy3 (rouge) est assigné à un groupe de bactéries (famille ou genre) tandis que le fluorochrome FITC (vert) est assigné à toutes les bactéries. Ainsi les cellules qui contiennent les sondes hybridées peuvent être observées directement en microscopie à fluorescence. L'association de ces deux couleurs donne la couleur jaune par superposition de fluorescence.

Afin d'étudier le rapport entre une population bactérienne donnée et l'ensemble des microorganismes présents dans les sédiments, deux types de sondes ont été utilisées : une sonde spécifique à chacune des bactéries et diverses autres sondes spécifiques de plusieurs grandes familles bactériennes dont nous supposons la présence dans le sédiment.

Il devient alors possible pour chaque type de sonde utilisée de calculer la densité bactérienne du sédiment. Pour cela les bactéries visibles sont dénombrées dans le champ du microscope. Ce nombre est ensuite ramené à un nombre de microorganismes par mm^2 .

L'abondance relative d'une famille par rapport à l'ensemble des bactéries du sédiment peut également être calculée. Pour cela on divise le nombre x_i de bactéries comptées pour une famille précise par le nombre total de bactéries comptées pour cet échantillon.

Dans notre étude, les sondes sont ainsi appliquées au contenu des réacteurs afin d'évaluer l'évolution des microorganismes présents. En effet, les microorganismes se développent en fonction de leur substrat, et si celui-ci vient à disparaître, les bactéries doivent trouver une autre source d'énergie ou disparaître. L'identification de souches présentes dans les fermentations liquides ont permis d'orienter le choix des sondes et de les diriger sur des genres ou des familles de microorganismes définies (*Pseudomonas*, *Nitrosomonas*, *Enterobacter*, *Archeobacter*, *Nitrobacter*, α Protéobactéries, β Protéobactéries, γ Protéobactéries, ...). Ces sondes ont été ajoutées aux prélèvements effectués durant la cinétique de fonctionnement des réacteurs. Des lames de microscopie comportant 8 puits ont été utilisées, ces puits comportent un léger relief permettant de réaliser différents traitements sur une même lame. (Cf Figure 56)

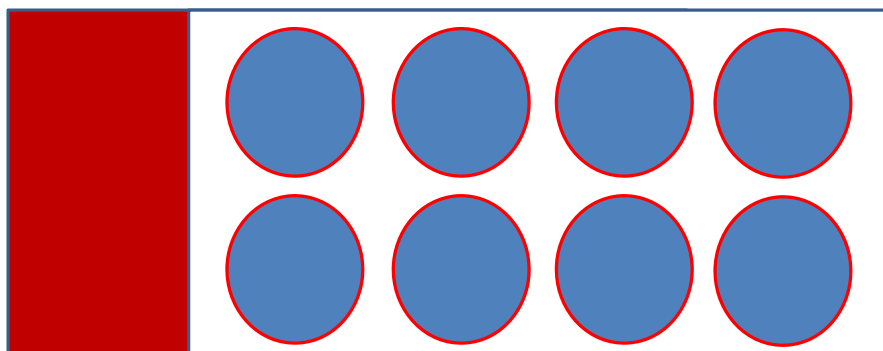


Figure 56 : Lamme de microscopie pour hybridation in situ par fluorescence à 8 puits.

Les premiers essais ont été réalisés au temps 150 jours (après 5 mois de fonctionnement du réacteur), sur un deuxième réacteur. Ainsi le sédiment extrait du réacteur a été fixé, puis placé sur une lame et exposé à différentes sondes. Le protocole exact est détaillé en Annexe VIII.

Différentes sondes ont été appliquées aux prélèvements. Les bactéries que nous avons étudiées peuvent être regroupées en différentes classes regroupées dans le Tableau 21.

Tableau 21 : Sondes FISH appliquées aux familles et à certaines espèces de bactéries.

Sondes appliquées aux familles / classes ou domaines de microorganismes	Sondes appliquées aux espèces (correspondant aux genres bactériens)
α Proteobacteries	<i>Nitrobacter</i>
β Proteobacteries	<i>Nitrosomonas</i>
δ Proteobacteries	<i>Geobacter</i>
γ Proteobacteries	<i>Pseudomonas, Enterobacter</i>
Firmicutes (ou LGC)	<i>Clostridium</i>
Archéobacteries	

e) Suivi d'un réacteur par traçage radioactif

Etant donné la complexité de la boue l'identification précise de métabolites issus de la dégradation des composés nitrés a été difficile. Dans l'objectif d'identifier des métabolites, l'ajout de [^{14}C]-hexogène sur un réacteur a été envisagé. Deux expériences principales ont été menées. Tout d'abord, du [^{14}C]-hexogène a été ajouté à un réacteur ayant déjà fonctionné pendant plus de 100 jours, afin d'évaluer la faisabilité et contrôler une éventuelle dégradation de l'hexogène. Par la suite, un réacteur a été réinitié dans l'objectif de recréer une dynamique de dégradation proche de celle atteinte sur les réacteurs mixtes en travaillant avec du [^{14}C]-

TNT et du [^{14}C]-hexogène. Ces expériences sont le fruit d'une collaboration entre le laboratoire ECOLAB et le laboratoire des Xénobiotiques de l'INRA de Saint Martin du Touch.

1. Surcharge du réacteur par du [^{14}C]-hexogène

Une première expérience incluant du [^{14}C]-hexogène a été lancée sur un réacteur ayant déjà fonctionné pendant 105 jours. Ce réacteur a été préalablement déplacé dans le laboratoire des Xénobiotiques de l'INRA, habilité à travailler sur des matériaux radioactifs. Après ajout de 15 μCi de [^{14}C]-hexogène et 29,4 mg d'hexogène froid, des prélèvements de 500mL ont été effectués à intervalles réguliers de 0 à 8 semaines.

Préparation des échantillons : chaque prélèvement est préalablement filtré sur GFA (fibre de verre) de 4,7 cm de diamètre afin de se débarrasser des matières en suspension.

Un millilitre de filtrat est ajouté à 20 mL d'ultimer gold scintillant pour le comptage de la radioactivité. Le comptage est effectué par un scintillateur Beta Packard A2200.

Une étape de préconcentration sur cartouche Envi C18 (5g), Supelco. L'élution est réalisée par un volume de 8,5mL de MeOH à 100%. La radioactivité est également dosée après cette étape. Le volume d'éluat est ramené à 100 μL grâce à un speed vac (appelée phase séchée).

Les conditions chromatographiques sont les suivantes :

- HPLC Packard
- colonne C18 (Bischoff RP column)
- Solution A : Acétonitrile (ACN)/ Eau (3 : 97)
- Solution B : ACN /Eau (40 : 60)
- Débit 1mL.mn⁻¹
- Température de colonne : 40°C.
- Gradient linéaire de 45mn (passe de 100% de solution A à 100% de solution B en 45 minutes).
- 10 μL de phase séchée sont dilués avec 100 μL de solvant A pour injection.

Le dosage de la radioactivité est effectué par un flow one Beta A515 ainsi que par un scintillateur flowscint : 2mL/1mL de phase. Le temps de rétention de l'hexogène est de 13,9mn.

2. Surcharge d'un réacteur à $t=0$ par du $[^{14}\text{C}]$ -hexogène et du $[^{14}\text{C}]$ -TNT

Une seconde expérience a été réalisée au laboratoire des xénobiotiques de l'INRA en relançant un réacteur à $t=0$ dans les mêmes conditions que celles décrites au paragraphe A et B. Deux produits radiomarqués ont été ajoutés après 2 jours de stabilisation du réacteur, à savoir du TNT et de l'hexogène dans les concentrations respectives suivantes : 17,2 μCi et 36 μCi .

Le dosage des composés s'est effectué selon le même protocole que celui décrit précédemment.

I. Résultats

A. Suivi préalable du pH

La biodisponibilité des composés organiques étant directement fonction de leur solubilité et donc du pH du milieu, un suivi de ce dernier a été réalisé dans chacun des réacteurs. Comme le montre la Figure 57, le pH a globalement la même évolution dans les trois réacteurs. Une acidification du milieu est observée durant les 20 premiers jours. Le pH remonte alors progressivement jusqu'à 75 jours pour se stabiliser aux environs de 7.

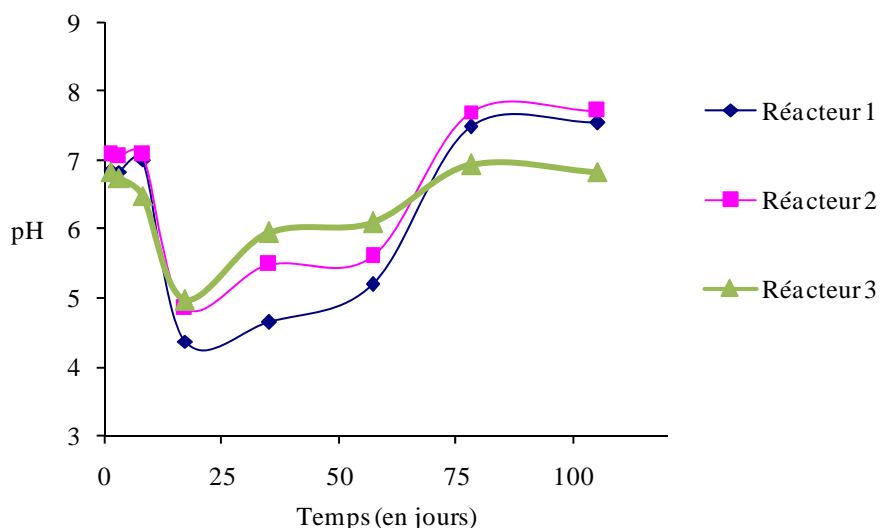


Figure 57 : Evolution du pH des réacteurs au cours du temps.

B. Cinétique de disparition des explosifs et herbicides

Les résultats des Figure 58 et Figure 59 nous montrent que les concentrations des 4 composés dosés augmentent durant les 4 premiers jours. Nous pouvons en déduire que la cinétique de dissolution est lente, mais suffisamment rapide pour suivre la disparition des produits.

La Figure 58 présente l'évolution des explosifs dans les réacteurs. L'hexogène semble être consommé en moins de 40 jours, la dégradation débutant dès 8 jours de fonctionnement du réacteur. L'octogène, plus stable, demande 105 jours pour disparaître totalement, la dégradation ne débutant pas avant 45 jours.

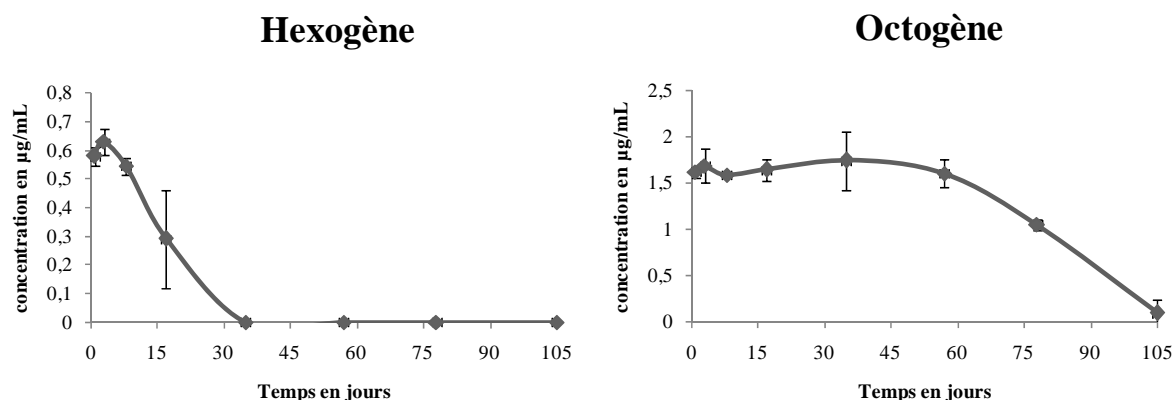


Figure 58 : Cinétique de dégradation des explosifs dans les réacteurs. (Ecart-type , n=3)

Concernant les herbicides (Figure 59), le Dinoterb (DNTB) et le Dinoseb (DNSB) sont consommés en 18 jours, leur disparition débutant dès 3 jours. La dégradation de ces composés évolue de la même façon que le pH. Ces composés étant dégradés en anaérobiose, on peut penser que leur transformation a lieu dans le fermenteur et s'accompagne d'une acidification du milieu.

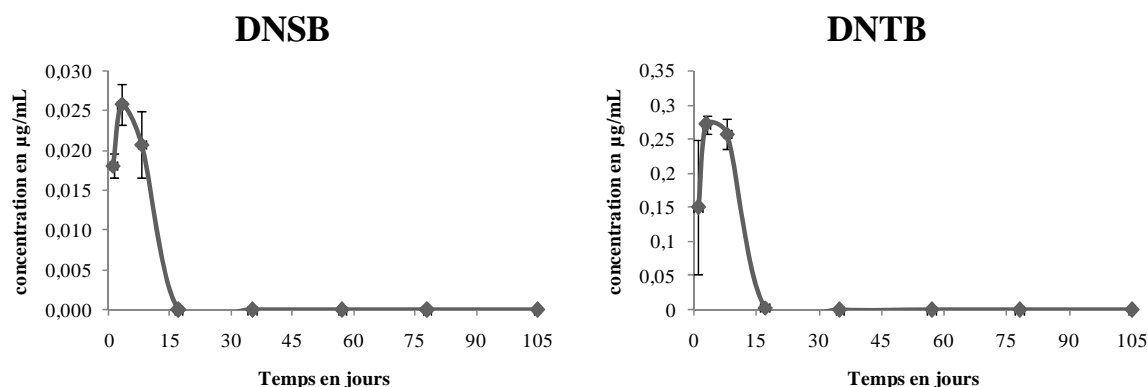


Figure 59 : Cinétique de dégradation des herbicides Dinoterb (DNTB) et Dinoseb (DNSB) dans les réacteurs. (Ecart-type, n=3)

a) Disparition d'un composé X

Comme le montre la Figure 60, un ion de masse 237 apparaît au début de la cinétique. Cet ion disparaît rapidement en 30 jours. De plus, en comparant ces résultats à la Figure 59, nous constatons que cet ion a la même cinétique que le Dinoseb et le Dinoterb. L'ion 237 peut correspondre à une perte de masse de 2 par rapport au Dinoseb et au Dinoterb. Il peut ainsi correspondre à une forme de transition avant l'étape suivante de dégradation de ces molécules. De plus, cet ion étant majoritairement présent en début d'expérience et étant donné la complexité du sédiment, nous pouvons également penser qu'un composé inconnu déjà présent dans le sédiment a pu se dégrader au cours du temps. L'absence de commercialisation d'étalons de produits de dégradation du Dinoseb et du Dinoterb nous empêche de confirmer cette hypothèse.

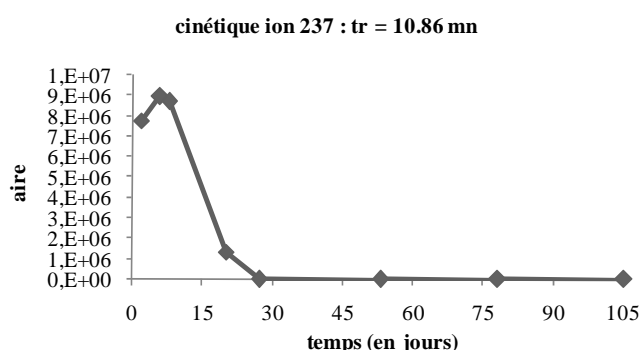


Figure 60 : Cinétique d'apparition de métabolites potentiels issus de l'essai en réacteur.

b) Apparition d'un composé Y

De même un ion de masse 206 apparaît après 10 jours (Figure 61). Cet ion atteint une concentration maximale à $t=90$ jours. Son apparition semble se faire de manière parallèle à la disparition de l'octogène. Il n'existe cependant aucune preuve bibliographique permettant de rapprocher son identité d'un éventuel métabolite de l'octogène. Cet ion peut être issu d'un autre composé non dosé qui se serait dégradé dans le milieu.

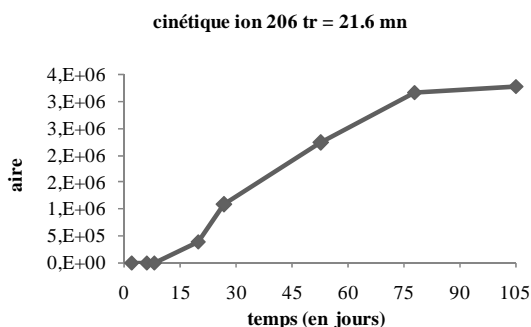


Figure 61 : Cinétique d'apparition d'un composé à $m/z=206$.

Il est important de constater que le taux d'octogène reste constant durant soixante jours, puis est dégradé en moins de vingt jours. Ces résultats soulignent l'importance des conditions expérimentales et le rôle des microorganismes. Ainsi, nous avons pu constater qu'après 40 jours de culture des champignons filamenteux se développaient dans les cuves aérobies. Il existe un délai entre le début de dégradation de l'hexogène et celui de l'octogène, ceci a déjà été constaté à plusieurs reprises. En effet, Shen *et al.* (2000) ont montré que lorsque l'hexogène et l'octogène sont présents tous les deux dans un milieu, l'hexogène est consommé presque entièrement avant que l'octogène ne commence à être dégradé. De même, dans une étude visant à dégrader le TNT, l'hexogène et l'octogène dans le même milieu, le TNT doit être dégradé et consommé avant que l'hexogène ne commence à être dégradé (Light *et al.*, 1997). Dans cette même étude, les auteurs ont montré que la consommation de l'hexogène devait être finie avant que ne commence la dégradation de l'octogène. Le TNT ayant une structure proche des dinitrophénols, nous pouvons observer que le Dinoseb et le Dinoterb sont dégradés dans un premier temps, l'hexogène est dégradé par la suite et enfin l'octogène.

Cette cinétique met en évidence une activité microbienne importante permettant de dégrader une grande partie des composés organiques présents dans le sédiment.

L'apparition de produits secondaires a pu être observée dans le réacteur après 20 jours de fonctionnement. La caractérisation de ces molécules grâce à leur masse est délicate, étant donné la complexité du sédiment et l'origine multiple que peuvent avoir ces ions.

De même, un ion de masse 206 apparaît quelques jours après le début de l'expérience, avant même la dégradation. Cet ion ne correspond à aucune molécule clairement identifiée.

La présence d'autres métabolites a été identifiée dans les réacteurs (Figure 62). En effet l'observation du spectre UV révèle des pics qui apparaissent avant l'octogène, et au fur et à mesure que ce dernier disparaît. Ces pics ont été nommés composé Z et composé W. La cinétique d'apparition de ces pics correspond à la cinétique de disparition de l'octogène. Astratov *et al.*, 1997 ont montré que le SEX (octahydro-1-N-acetyl-3,5,7-trinitro-1,3,5,7-tetrazocine) était un sous produits formé lors de la synthèse de l'octogène qui sur un chromatogramme est élué juste avant l'octogène. Nous pouvons émettre l'hypothèse que le composé W puisse être assimilé au SEX, de masse identique. Dans notre cinétique ce produit apparaît après 57 jours de fonctionnement jusqu'à 105 jours. A l'heure actuelle, aucune explication ne peut être apportée pour expliquer l'apparition de ce métabolite.

De même, un composé Z est visible après 57 jours de fonctionnement du réacteur. Peu d'études ont été réalisées sur la métabolisation de l'octogène. Toutefois, McCormick *et al.* (1984) ont montré la réduction de l'octogène en dérivés mono-, di-, et tri-nitroso dans des conditions anaérobies. Ces mêmes métabolites ont été mis en évidence par Boopathy en 2002 sur des cultures menées en conditions méthanogènes, de fermentation, ainsi que dans des conditions sulfate et nitrate réductrices. Le composé Z apparaît juste avant l'octogène sur le chromatogramme et possède la même masse $m/z = 279$ que le mono nitroso octogène. Par conséquent nous pouvons penser que le composé Z peut être assimilé au dérivé mono nitroso de l'octogène.

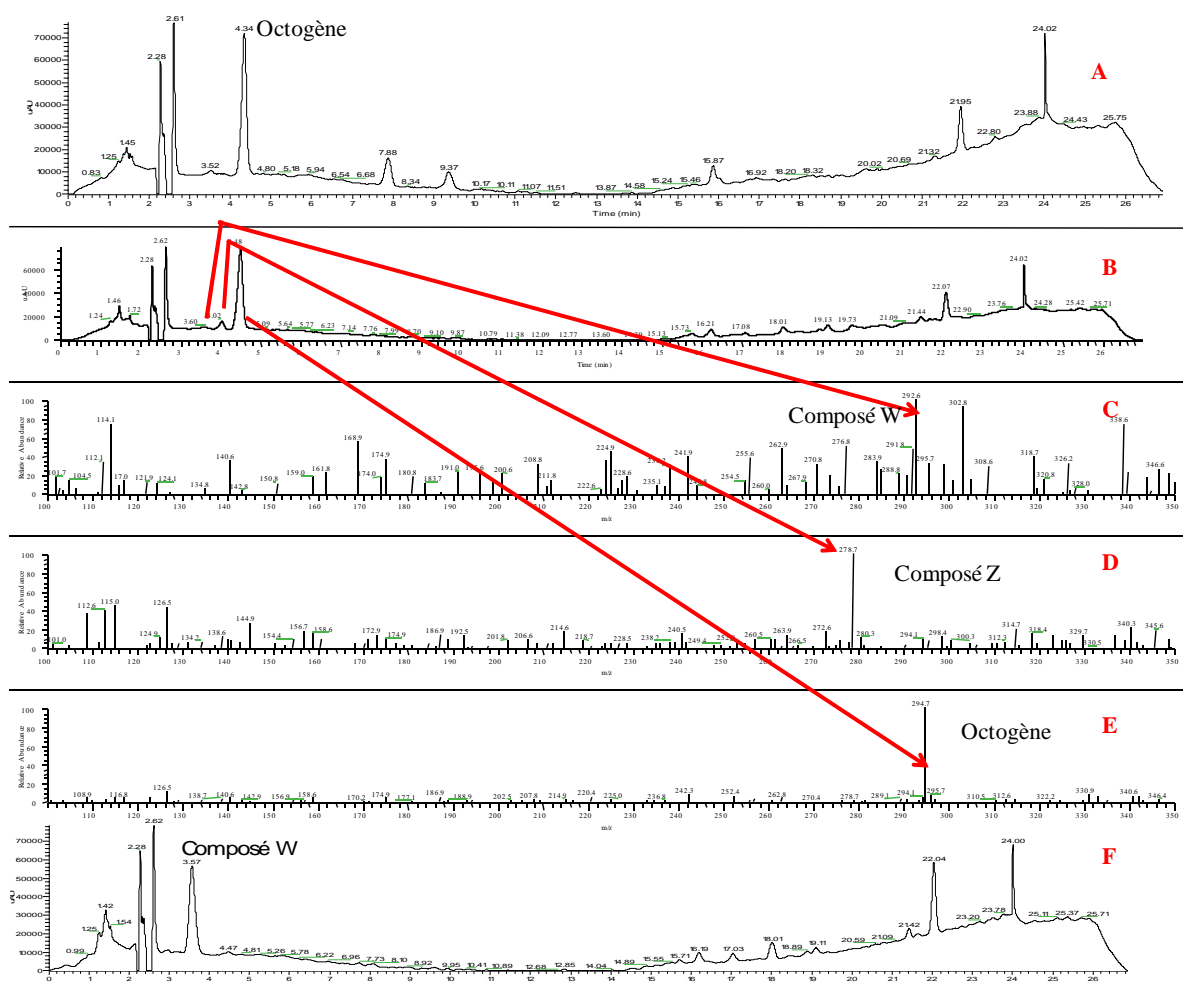


Figure 62 : Métabolites observés dans les réacteurs entre 57 et 105 jours de fonctionnement

A : chromatogramme UV observé à T=5 jours, B : Chromatogramme UV observé à T= 57 jours, C : spectre de masse du composé W, D : spectre de masse du composé Z, E : spectre de masse de l'octogène, F : chromatogramme UV observé à t=105 jours.

En conclusion, nous pouvons dire que le réacteur présenté dans ces travaux permet une dégradation rapide des dinitrophénols en 18 jours par rapport aux fioles de fermentations qui nécessitaient 75 jours. De plus, l'hexogène et l'octogène sont dégradés en respectivement 40 et 105 jours. Il semble que l'alternance des phases aérobie et anaérobie joue un rôle important sur la disparition des deux molécules.

C. Suivi des anions

Parallèlement aux expériences de dosage des produits nitrés, un dosage des principaux anions potentiellement impliqués dans la dégradation a été effectué. Les principaux résultats obtenus sont présentés sur la Figure 63.

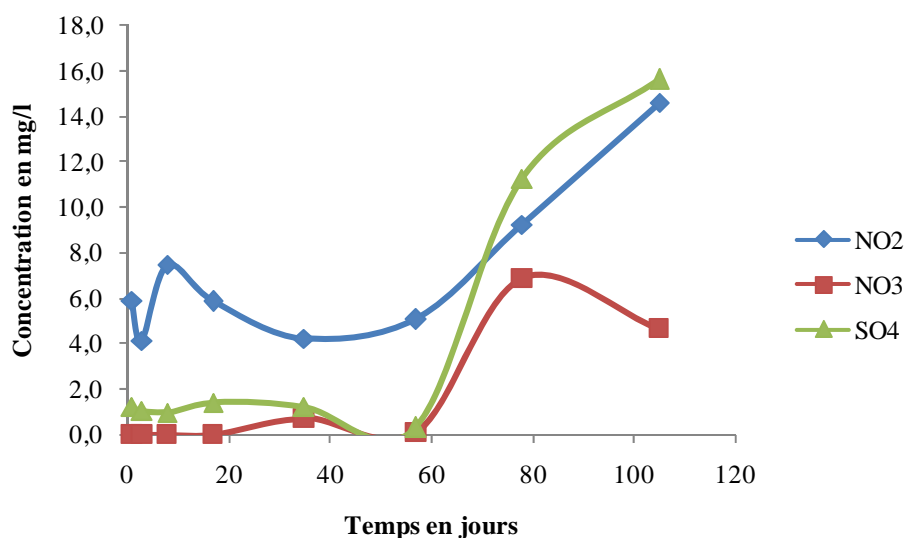


Figure 63 : Suivi des anions durant le fonctionnement d'un réacteur.

Les résultats font état d'une augmentation de la concentration en NO_2 , NO_3 et SO_4 à partir de $t=60$ jours. L'augmentation de SO_4 pourrait être issue de la dégradation de produits organiques soufrés (sulfonates) dont la présence est fortement envisagée. En effet, nous avons montré dans l'étude physico-chimique du sédiment une très faible concentration en soufre minéral malgré la forte teneur en soufre total (Chapitre 1). Ces résultats permettaient de mettre en évidence la présence de soufre d'origine organique susceptible d'être dégradé et relargué dans le milieu sous forme minérale lors du processus. L'apparition de NO_2 et NO_3 est en corrélation directe avec la dégradation des composés nitrés (nitrophénols et nitramines). Plusieurs facteurs laissent penser que les produits sont dégradés en aérobie entre 60 et 105 jours. Tout d'abord le pH remonte entre 60 et 105 jours ce qui peut nous laisser penser à un contrôle du pH par les bactéries fonctionnant plus en conditions aérobie. De plus, du NO_2 apparaît et semble rapidement transformé en NO_3 . Toutefois, la concentration en NO_2 ne diminue pas après 60 jours. Deux hypothèses peuvent être avancées. Soit le NO_3 est consommé par les microorganismes plus vite que l'oxydation du NO_2 n'a lieu, soit la transformation du NO_2 en NO_3 est inhibée.

D. Dynamiques des populations dans le fermenteur

Le FISH a pour but d'estimer le rôle des grandes familles bactériennes dans la dégradation des composés nitrés et d'essayer d'identifier des couples « Bactérie - composé organique » ce qui permettrait par la suite de stimuler spécifiquement la dégradation des herbicides ou des explosifs par le biais des bactéries adaptées.

Des sondes spécifiques sont appliquées aux prélèvements. Par exemple, une sonde spécifique à la souche *Pseudomonas* a été appliquée à l'échantillon prélevé sur le réacteur (Figure 64), nous pouvons ainsi constater que *Pseudomonas* est présent dans la phase aérobie du réacteur. Nous avons pu auparavant mettre en évidence le rôle important que pouvait jouer *Pseudomonas* dans la dégradation des herbicides au cours des expérimentations de fermentations en milieu liquide. La confirmation de la présence de *Pseudomonas*, dans les nouveaux réacteurs peut laisser supposer que cette souche joue également un rôle dans la dégradation de certains produits dans les réacteurs. De plus *Pseudomonas* est anaérobie facultative ce qui lui permet de transiter entre les deux systèmes aérobie et anaérobie.

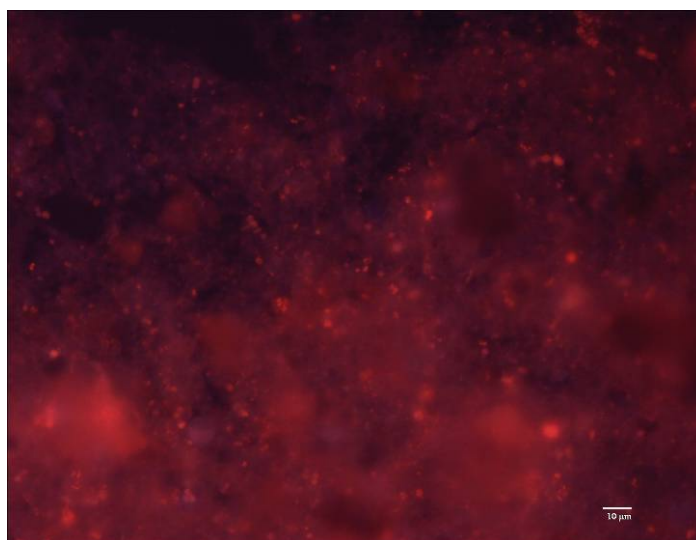


Figure 64 : FISH obtenu avec une sonde dirigée sur l'ARNr 16s de *Pseudomonas*.

Le comptage a été effectué sur les photos réalisées par sonde et pour des temps de prélèvement selon le protocole défini en annexe VII. Ainsi chaque famille de microorganisme a été dénombrée dans le compartiment aérobie. Un bilan de l'évolution du nombre total de positifs au cours du temps est présenté sur la Figure 65.

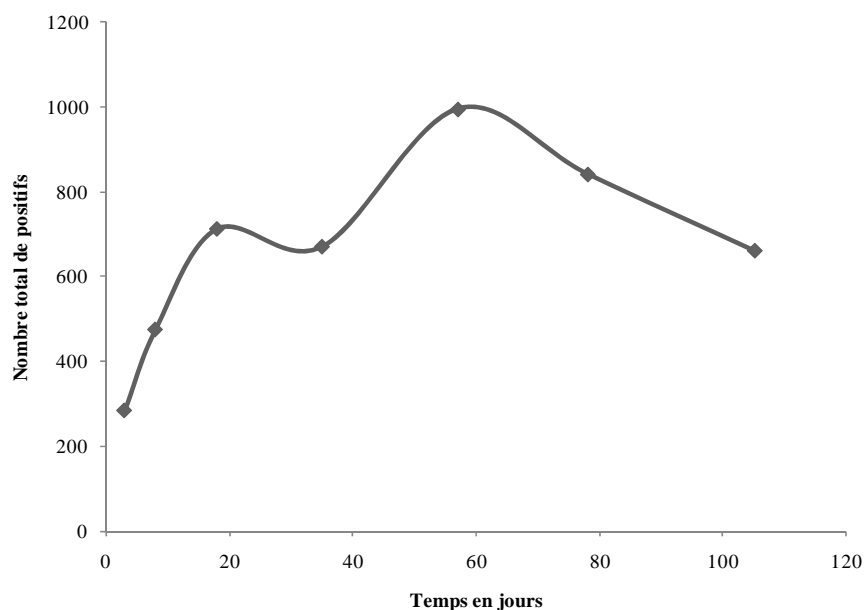


Figure 65 : Nombre total de positifs observés au cours du fonctionnement d'un réacteur

Dans un premier temps, nous pouvons observer une croissance rapide de la microflore durant les 20 premiers jours, suivie d'une légère lyse des bactéries entre 20 et 30 jours. Une nouvelle augmentation du nombre total de positifs a lieu entre 40 et 60 jours. De 60 à 105 jours, une lyse des bactéries peut être observée.

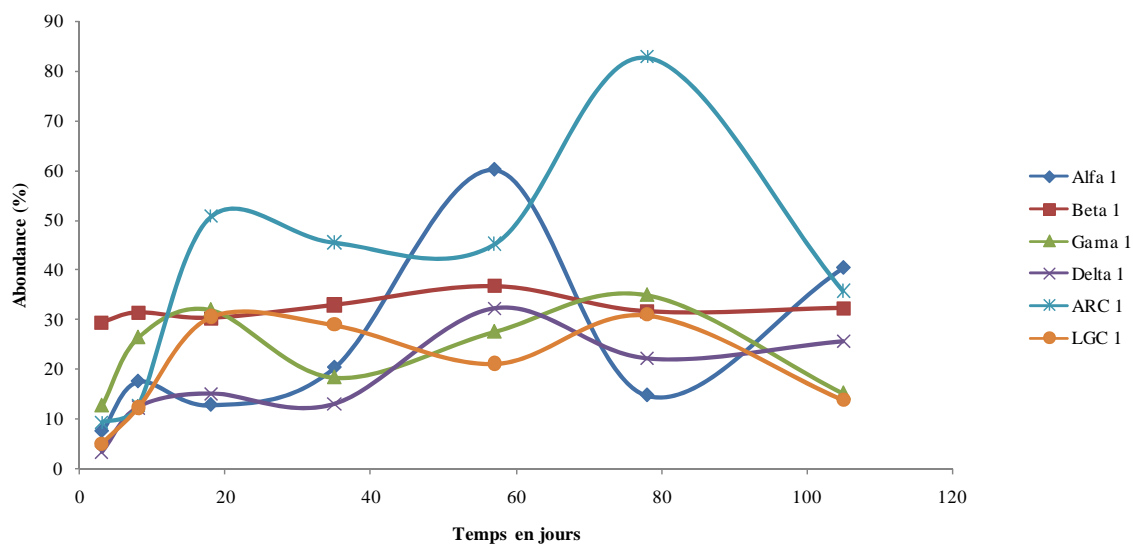


Figure 66 : Abondance relative totale en familles de microorganismes dans le réacteur

La Figure 66 montre l'évolution de l'abondance relative des différentes familles de microorganismes. D'une manière générale, les Archéobactéries (bactéries anaérobies) semblent

prédominer durant la majeure partie du temps de fonctionnement du réacteur. Le temps de séjour dans la colonne étant très court et le temps de division des Archébactéries étant assez long, la division de ces dernières peut débuter dans le réacteur en anaérobiose stricte pour finalement se retrouver dans un compartiment où les conditions d'anaérobiose seront moins strictes. En réalité, il est possible que les prélèvements effectués dans le compartiment aérobie prennent en compte des bactéries décrochées du biofilm se trouvant dans le fermenteur. Concernant les Archébactéries, nous pouvons observer deux pics de croissance, l'un à 20 jours et l'autre à 80 jours : les Archébactéries ne peuvent utiliser que les sous produits de dégradation simples : acides gras volatils, H_2 , CO_2 , ... Leur croissance correspond essentiellement aux deux phases de dégradation des molécules organiques.

La proportion d' α Proteobactéries augmente entre 40 et 60 jours pour diminuer progressivement jusqu'à 80 jours.

La technique du FISH nous permet de réaliser une évaluation des familles spécifiques présentes dans les réacteurs et tenter d'établir une corrélation entre la disparition des produits et la présence des différentes familles. En effet, l'apparition de Nitrobacter peut par exemple être corrélée à l'apparition de nitrites en quantités importantes. Une comparaison entre l'évolution des espèces de microorganismes et la dégradation des composés nitrés peut être réalisée. Nous pouvons remarquer que la population de Nitrobacter croît jusqu'à 20 jours de manière parallèle à la dégradation des nitrophénols et de l'hexogène. La croissance des bactéries se stabilise alors, puis réaugmente jusqu'à 80 jours pour ensuite diminuer rapidement. Ces résultats semblent indiquer que ces espèces pourraient être impliquées dans le métabolisme des différents composés.

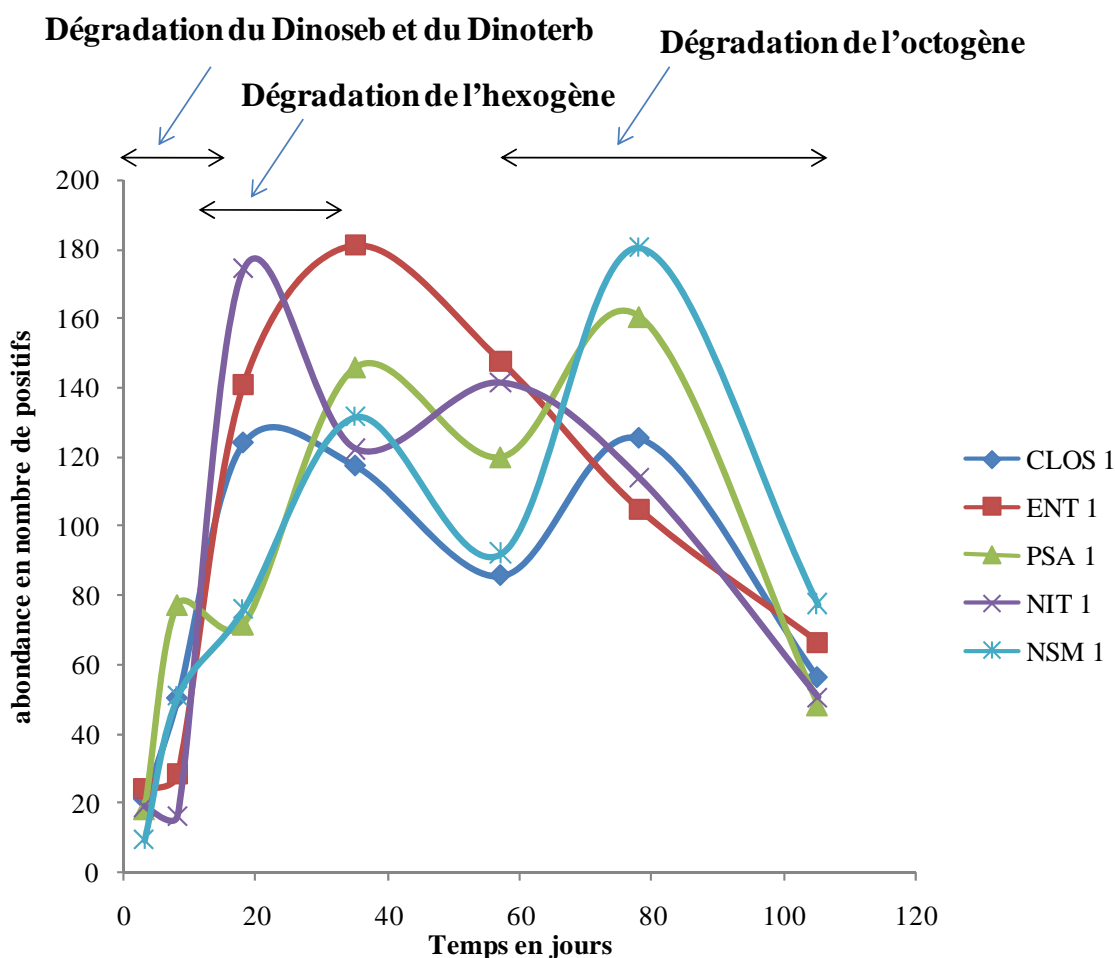


Figure 67 : Abondance en microorganismes dans le réacteur (en nombre de positifs)

La cinétique de développement des Enterobactéries se caractérise par une phase de croissance jusqu'à 35 jours suivie d'une phase de lyse jusqu'à 105 jours. Les Enterobactéries peuvent également être impliquées dans la dégradation des nitrophénols et de l'hexogène. Par contre, les Clostridium connaissent deux phases de croissance, une entre 0 et 20 jours et une entre 60 et 80 jours. Pseudomonas est caractérisé par 3 phases de croissance de 0 à 8 jours, de 20 à 40 jours et de 60 à 80 jours, une phase de régression pouvant être observée entre 40 et 60 jours. Ce genre bactérien connaît également une phase de régression entre 40 et 60 jours. Pseudomonas peut être impliqué dans la dégradation des nitrophénols comme des nitramines. En effet, sa courbe de croissance semblant suivre la dégradation du Dinoseb et du Dinoterb dans un premier temps, puis de l'hexogène et enfin de l'octogène.

Le Dinoseb et le Dinoterb semblent servir de substrat de croissance à une grande partie des bactéries qui débutent leur croissance dans les premiers jours d'installation du réacteur. Si l'on considère l'ensemble des cinétiques, à l'exception des α -Proteobacteries et des Enterobactéries, toutes les espèces et les genres connaissent une croissance en deux temps,

avec une phase de régression entre 40 et 60 jours. Les Enterobactéries se développent durant les 40 premiers jours, puis régressent totalement jusqu'à 105 jours. Les α -Proteobacteries vont se développer entre 40 et 60 jours pour devenir majoritaires à 60 jours. Elles vont ensuite régresser et reprendre le dessus entre 80 et 100 jours. Les α -Proteobacteries vont donc suivre une évolution inverse à celles des Archéobactéries. Le rôle de ces espèces reste difficile à déterminer dans les processus de biotransformation des molécules puisqu'elles évoluent à l'inverse de la dégradation des molécules mères. Elles pourraient en revanche intervenir dans le métabolisme des sous produits de dégradation pour se développer.

E. Suivi des métabolites par traçage radioactif

a) Surcharge du réacteur par du $[^{14}\text{C}]$ - hexogène

Afin de déterminer les produits de dégradation du $[^{14}\text{C}]$ - hexogène dans ce réacteur, celui ci a été surchargé, après 2 mois de fonctionnement, avec 10 mg d'hexogène contenant 5 mCi de $[^{14}\text{C}]$ -hexogène afin de suivre exhaustivement sa dégradation. La réaction a été suivie pendant 2 mois supplémentaires en régime normal de fonctionnement du réacteur.

Des prélèvements d'effluents ont été régulièrement effectués. Après 96 h de fonctionnement, la radioactivité s'est stabilisée dans le réacteur montrant la rapide homogénéisation du $[^{14}\text{C}]$ -hexogène dans l'effluent. Ensuite, pendant les 2 mois qu'a duré l'expérimentation la radioactivité est restée stable. Cela démontre que dans ce cas, la molécule n'a pas été minéralisée en $[^{14}\text{C}] \text{CO}_2$ ni retenue sur la pouzzolane, le biofilm ou les parois du réacteur.

Les différents échantillons prélevés ont ensuite été analysés par radio-HPLC en phase inverse. Tous les échantillons présentent du $[^{14}\text{C}]$ -hexogène. Ainsi contrairement à ce qui pouvait être espéré au regard des analyses effectuées au cours du premier cycle de fonctionnement du réacteur, montrant la dissipation totale de l'hexogène au-delà du 30ème jour, l'hexogène n'a pas été totalement métabolisé durant le deuxième cycle. Toutefois, deux métabolites ont été retrouvés en plus de l'hexogène dont un est montré sur la Figure 68.

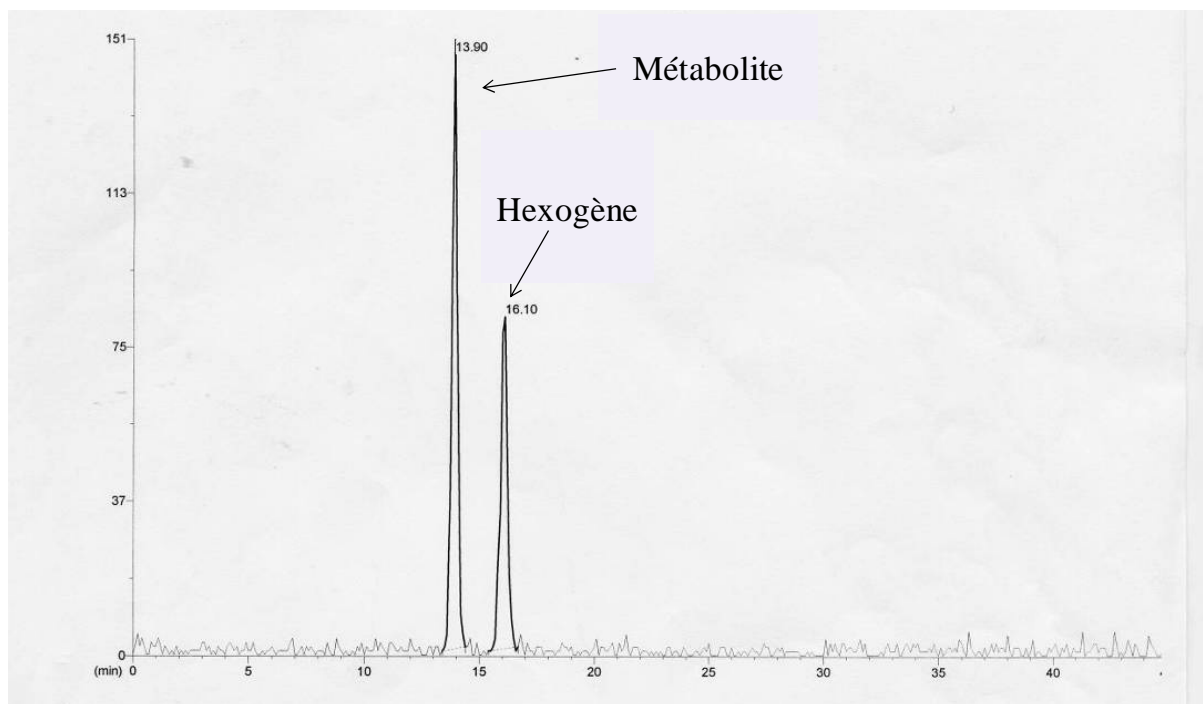


Figure 68 : Radio-chromatogramme de l'effluent du réacteur 1 après 96 h de fonctionnement avec une charge en [^{14}C] hexogène (15 μCi , 5 mg).

Le premier apparaît vers le 10^{ème} jour et le second plus tardivement vers la 4^{ème} semaine d'incubation. L'analyse en spectrométrie de masse de ces deux métabolites en a permis une identification partielle. Le premier métabolite qui est détecté correspond à un composé monodénitrifié.

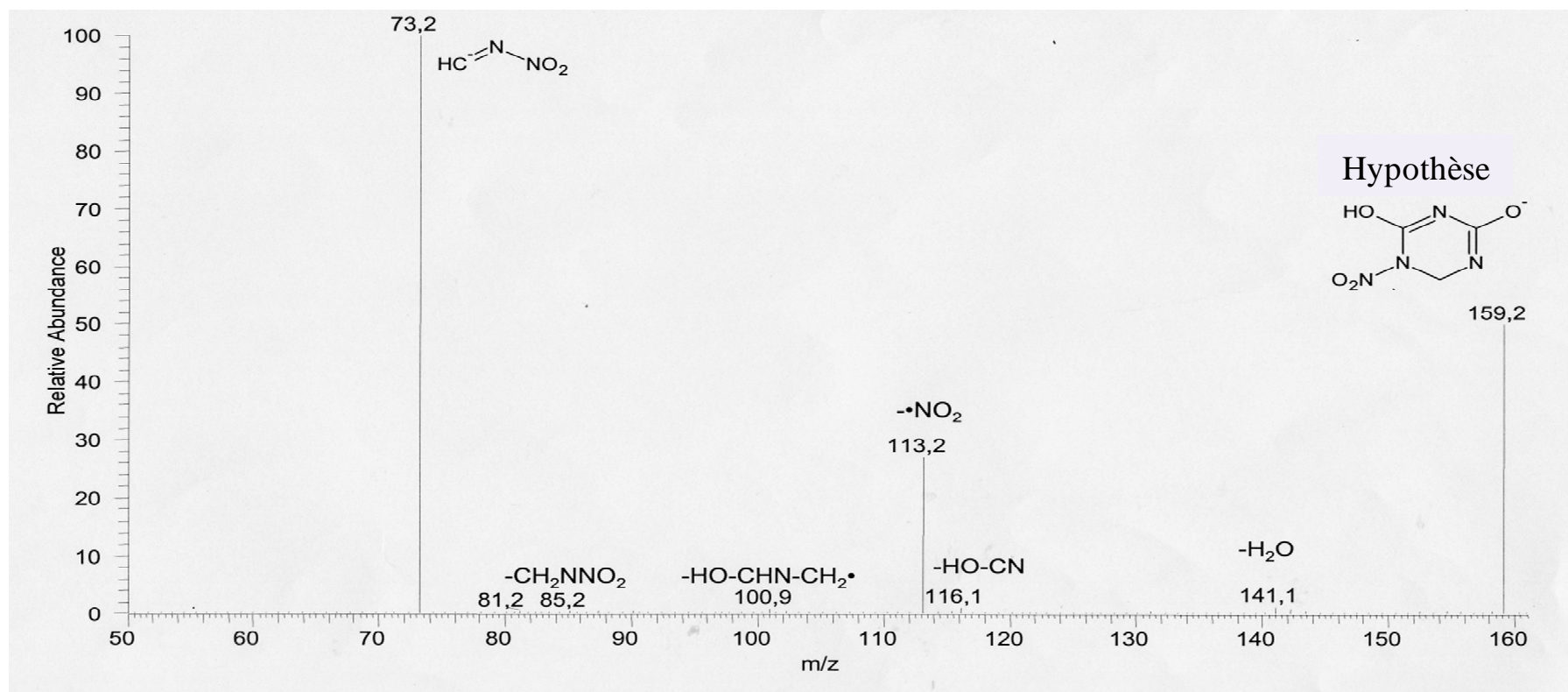


Figure 69 : Spectre de masse de métabolite retrouvé après 96 h d'incubation du premier réacteur

Le second métabolite est de manière surprenante de plus haut poids moléculaire. Bien que sa structure n'ait pu encore être identifiée, il semble correspondre à une polymérisation du métabolite précédent avec un fragment de masse $m/z = 73$. Des analyses complémentaires sont en cours pour identifier ce métabolite.

La présence encore en quantité importante d'hexogène, même après 2 mois d'expérimentation, semble en contradiction avec les résultats précédents. Il a cependant été montré que la flore bactérienne du réacteur évoluait au cours du temps, tant en quantité qu'en nature de germes présents dans le réacteur. Aussi, il est probable qu'en fin de cycle, les bactéries présentes ne seraient plus les mêmes que durant les premiers 30 jours où l'hexogène est plus efficacement dégradé.

b) Surcharge d'un réacteur à $t=0$ par du $[^{14}\text{C}]$ -hexogène et du $[^{14}\text{C}]$ -TNT

Afin de vérifier l'hypothèse d'une évolution de la microflore, un nouveau réacteur a été mis en place. Ainsi le réacteur a été réensemencé avec du sédiment frais sur un support de pouzzolane nouveau. Après deux jours de fonctionnement, le réacteur a été surchargé avec 36 μCi de $[^{14}\text{C}]$ -hexogène. Une seconde molécule, du $[^{14}\text{C}]$ -TNT (17,2 μCi) a aussi été rajoutée afin de suivre en parallèle la dégradation des deux composés. Des prélèvements ont été effectués toutes les 24h pendant une semaine puis tous les 7 jours pendant 2 mois. Afin de contrôler l'adsorption, un lavage de la pouzzolane a été effectué après 2 mois de culture, suivi d'un dosage de la radioactivité résiduelle. Cette radioactivité est très faible : environ 0,1 μCi soit environ 1 pour mille de la quantité injecté dans le réacteur. Ce résultat montre que l'hexogène et le TNT n'ont pas été adsorbés sur la pouzzolane. La stabilité de la radioactivité relative au $[^{14}\text{C}]$ -hexogène au cours du temps observée lors de la première expérience confirme cette hypothèse.

L'analyse de la radioactivité des échantillons montre qu'après une phase de stabilisation, la radioactivité décroît régulièrement pour atteindre au 60ème jour de fonctionnement 20% de la radioactivité initiale. Cela suggère une minéralisation complète d'une partie des composés. Les analyses des prélèvements par radio-HPLC montrent une disparition très rapide du TNT (environ 24 h) et une dissipation plus faible de l'hexogène (Figure 70).

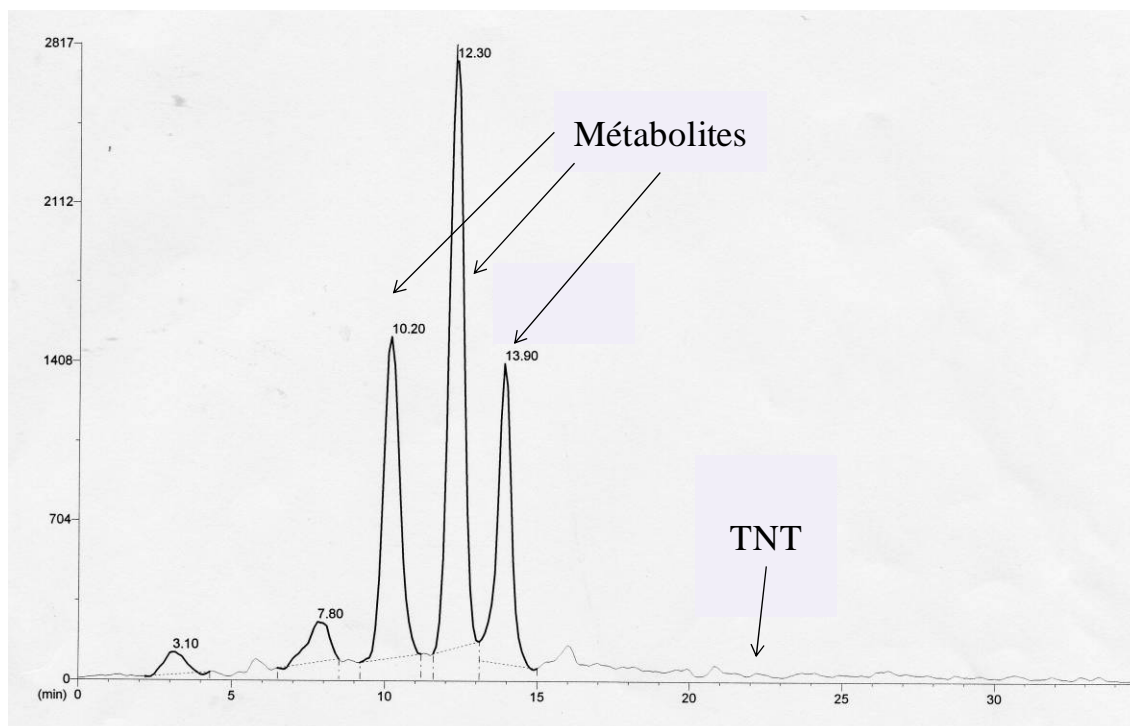


Figure 70 : Radio-chromatogramme de l'effluent du réacteur 2 après 3 jours de fonctionnement avec une charge en $[^{14}\text{C}]$ -hexogène (15 μCi , 5 mg) et en $[^{14}\text{C}]$ TNT (30 μCi , 5 mg).

Ces deux composés donnent environ 5 métabolites plus polaires que les composés parents. Toutefois, il faut noter qu'au bout de 2 mois, il ne reste pratiquement plus qu'un seul métabolite très polaire dans l'effluent, puisqu'il correspond à 89% de la radioactivité encore détectée à ce temps (Figure 71). Des études ont été réalisées sur du $[^{14}\text{C}]$ -hexogène mis en contact avec des bactéries. Parmi elles, une étude a été réalisée en exposant une bactérie capable de métaboliser le méthanol comme seule source de carbone avec du $[^{14}\text{C}]$ -hexogène (Van Aken, 2004). Après 4 jours, la radioactivité était concentrée en 3 pics, un pic correspondant à l'hexogène, un pic adjacent à l'hexogène correspondant au dérivé mononitroso de l'hexogène (MNX). Le troisième pic élué en début de chromatogramme a été identifié comme du MEDINA (méthylènedinitramine, $\text{O}_2\text{NNHCH}_2\text{NHNO}_2$ $M = 136 \text{ g.mol}^{-1}$). La concentration en MNX atteignait un maximum après 4 jours puis diminuait lentement jusqu'à un niveau inférieur au seuil de détection. De même, des travaux réalisés sur du sédiment marin issu d'une zone proche d'Hawaï incubé avec de l'hexogène durant 18 jours ont montré l'apparition de MEDINA, de MNX, de DNX, et de TNX (Bhatt, 2005).

Des expériences complémentaires doivent être réalisées avec des standards (MNX, DNX, TNX, ...) pour identifier plus précisément ces métabolites.

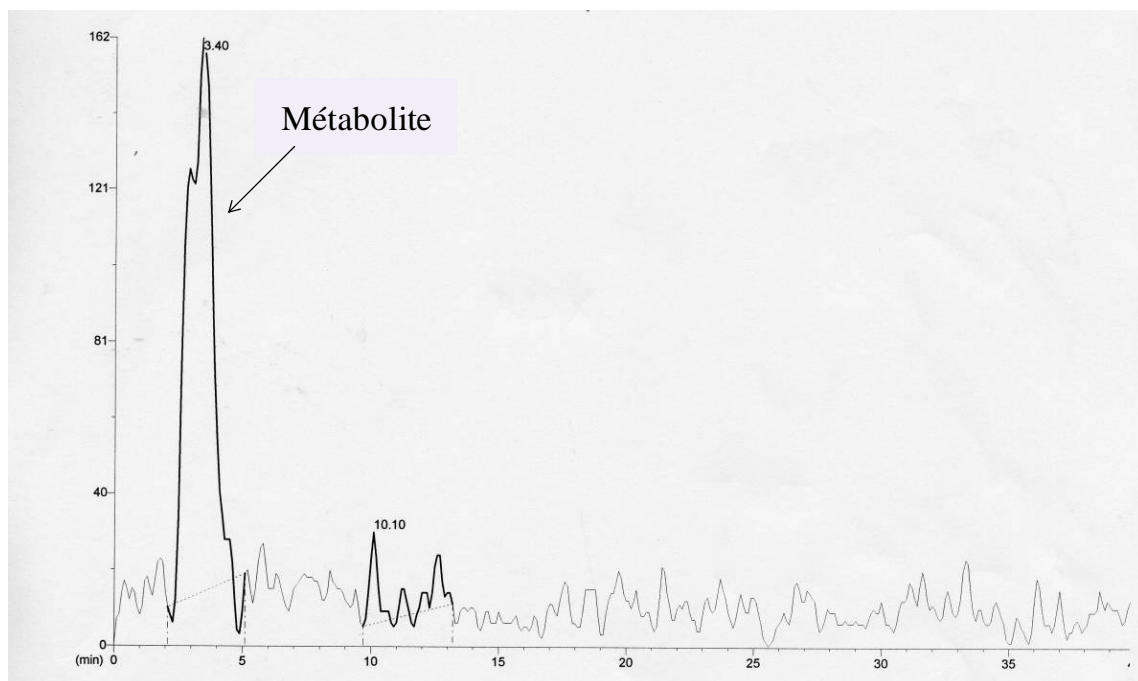


Figure 71 : Radio-chromatogramme de l'effluent du réacteur 2 après 8 semaines de fonctionnement avec une charge en [^{14}C]-hexogène (15 μCi , 5 mg) et en [^{14}C]-TNT (30 μCi , 5 mg).

Ces résultats suggèrent l'importance dans les différentes phases de dégradation des composés des assemblages bactériens. En effet, comme il a été montré dans le paragraphe B de ce chapitre, le Dinoseb et le Dinoterb sont métabolisés en moins de 20 jours, sans dégradation de l'hexogène et de l'octogène. La dégradation de l'hexogène intervient après disparition des deux herbicides, la dégradation de l'octogène intervenant après la dégradation totale de l'hexogène. Cette cascade d'événements suggère d'une part que les produits sont dégradés par ordre préférentiel, les herbicides, l'hexogène puis l'octogène et d'autre part que les consortiums bactériens effectuant ces opérations ne sont pas les mêmes entre le début et la fin des processus. L'efficacité du réacteur semble donc dépendre du régime d'ajout des composés à dégrader. De plus, il est possible que lors du fonctionnement normal du réacteur, certains composés ne soient pas entièrement métabolisés et conduisent à la formation de nouvelles molécules pouvant se condenser.

En conclusion, le réacteur biologique développé dans ce travail de thèse semble fonctionnel et permet de transformer 100% du TNT et de dégrader jusqu'à 80 % de l'hexogène radioactif injecté en 8 semaines. Malgré tout, un doute persiste sur la transformation de l'octogène en divers composés non identifiés. Des études avec de

l'octogène radiomarqué permettraient d'amener des éléments de réponse plus précis sur les métabolites formés.

Conclusion

Le projet initial visait à étudier les possibilités de biophytodépollution d'un site contaminé par du TNT et d'autres explosifs en supprimant si possible le risque pyrotechnique. Or, les premières données mises à notre disposition ainsi que les premiers bilans d'analyses physico-chimiques ont permis de mettre en évidence la présence supplémentaire de molécules herbicides ainsi qu'une part importante de carbone organique inconnue dans le sédiment (jusqu'à 32 % de carbone organique total). De plus, le dosage des composés organiques répertoriés dans le sédiment ne permettait d'expliquer que 58 % du carbone organique réellement présent dans la zone la plus contaminée, mettant en évidence une part importante de carbone organique inconnu. En effet, les procédés de synthèse des explosifs et des herbicides mettent en jeu des intermédiaires réactionnels, et même si les rendements des réactions de synthèse sont élevés (jusqu'à 80% pour l'hexogène, 70 à 85% pour l'octogène, Agrawal et Hodgson, 2007), les tonnages produits génèrent une multitude de produits organiques résiduels ou issus de condensations, transformations, conjugaisons de l'ordre de quelques grammes à quelques kilogrammes par jour. Après la seconde guerre mondiale, 800 000 tonnes de TNT ont été produites en Allemagne (Astratov *et al.*, 1997). Il a alors été estimé que cette production a conduit à 30 millions de m³ d'effluents et de 500 000 m³ de déchets solides, tous contaminés par de fortes teneurs en TNT et en sous produits toxiques. Ces composés peuvent avoir des propriétés multiples qui vont jusqu'à inhiber la croissance des microorganismes. En effet, des intermédiaires soufrés (dont la structure peut s'approcher des sulfamides utilisés comme antibiotiques) peuvent être présents dans la lagune et risquent de perturber la bioremédiation du site en inhibant la croissance bactérienne. De plus, la diversité des molécules et leurs concentrations élevées ont un effet direct sur leur solubilité. Une des conséquences directes est la modification possible de leur biodisponibilité, des interactions pouvant avoir lieu entre ces molécules (Zhang *et al.*, 2006, Boopathy, 2002)

L'analyse élémentaire, minérale et organique de ces constituants nous a permis de montrer que ces sédiments sont en réalité plus proches d'une boue industrielle que d'un sédiment. Des concentrations très importantes en herbicides ont remis en question une décontamination par phytodépollution. En effet, des tests de toxicité ont été réalisés sur la fève mise en présence de boue initiale diluée au 1000^{ème}. Après trois heures d'exposition, la mort des plantes a pu être constatée. Ainsi, l'aspect initial de phytodépollution a donc dû être revu en une étude de faisabilité de biodépollution en utilisant les microorganismes seuls dans un premier temps.

Parallèlement aux analyses physico-chimiques, un bilan microbiologique a été réalisé sur la zone la plus contaminée en composés pyrotechniques et en herbicides. Cette zone a été choisie pour effectuer les essais de bioremédiation, d'où la nécessité de connaître la microflore occupant cette zone. Après extraction de l'ADN bactérien présent dans la boue de la lagune, une technique de biologie moléculaire a permis de caractériser 8 espèces dans la boue dont 3 nouvelles. Certaines espèces sont phylogénétiquement proches de bactéries répertoriées pour avoir un potentiel de dégradation de molécules nitrées (phénols, nitramines...). Compte tenu de nos objectifs, nous n'avons pas cherché à isoler et cultiver ces germes afin de tester leur potentiel de dégradation. Nous avons opté pour une stratégie d'amplification des germes issus de ces sédiments en cherchant la meilleure stratégie pour (i) leur permettre de se développer ensemble et (ii) dégrader ces molécules riches en azote et en carbone.

Des essais de bioremédiation ont alors été mis en place sur la boue dans la zone la plus contaminée. Tout d'abord, des essais de bioremédiation en milieu aérobie ont été réalisés mais n'ont pas amené à une dégradation significative des composés. Dans un deuxième temps, des essais en réacteurs en milieu liquide et en conditions anaérobies ont été entrepris et ont permis d'observer la dégradation des nitrophénols en 75 jours. De plus, un bilan microbiologique effectué au terme des fermentations a permis de mettre en évidence 8 espèces appartenant à la famille des *Pseudomonaceae* et *Enterobacteraceae* particulièrement représentés dans le réacteur. Afin de vérifier le rôle de dégradation de ces familles, certaines espèces, *Leclercia adecarboxylata*, *Pseudomonas citronellolis*, et *Pseudomonas putida* ont été mises en culture et exposées au Dinoterb dans des conditions anaérobies. Cette expérience a permis de mettre en évidence le potentiel de dégradation de ces souches, ces dernières pouvant dégrader en 5 jours 82% du Dinoterb. Dans les conditions auxquelles nous sommes confrontées, l'anaérobiose est fondamentale à la dégradation des nitrophénols dans la boue contaminée. En effet, la dégradation du Dinoseb n'a pas été observée dans des conditions aérobies (Monnig et Zweidinger, 1980). En revanche, le paranitrophenol, de la famille des nitrophénols peut être dégradé par *Pseudomonas putida* dans des conditions aérobies (Kulkarni et Chaudari, 2006). Une autre souche de *Pseudomonas* sp Strain JLR11 ne dégrade le TNT que dans des conditions anaérobies (Esteve Nunez *et al.*, 2000).

Si certaines espèces présentes dans le sédiment sont répertoriées pour avoir une capacité de dégradation, les études sont pour la plupart réalisées en utilisant des souches isolées mises en contact avec un contaminant unique. Or notre matrice est extrêmement complexe et

composée d'une multitude de contaminants organiques connus pour certains, inconnus pour la grande majorité. Ceux ci peuvent avoir un effet direct sur les microorganismes et peuvent en inhiber leur croissance et leur potentiel métabolique. Des travaux ont montré qu'une solution de sol contenant du TNT, des métabolites du TNT ainsi que de l'hexogène avaient un pouvoir mutagène supérieur à une solution contenant un seul de ces composés (Berthe Corti *et al.*, 1998). Ces travaux mettent en avant des effets de synergie des différents composés organiques augmentant ainsi leur potentiel d'inhibition de croissance des bactéries.

Suite à ces expérimentations en anaérobiose, des réacteurs avec plusieurs compartiments regroupant à la fois des conditions aérobies et anaérobies mais aussi un lit fixé ont été mis en place. Ces derniers ont permis de mettre en évidence une dégradation successive des molécules et ce selon un ordre précis. En effet, les nitrophénols sont dans tous les cas les premières molécules dégradées (20 jours en moyenne). Après que le Dinoterb et le Dinoseb aient été totalement métabolisés, l'hexogène commence à être dégradé. De même, après que l'hexogène soit consommé (35 jours en moyenne), l'octogène commence alors à être consommé durant 105 jours. Cet ordre de dégradation préférentiel a déjà été observé à plusieurs reprises (Shen *et al.*, 2000 ; Light *et al.*, 1997). Ceci tend à mettre en évidence une certaine biodégradabilité des molécules. L'alternance des phases anaérobies puis aérobies associée à la présence d'un lit fixé semble améliorer la capacité de dégradation des microorganismes puisque les nitrophénols sont consommés deux fois plus vite qu'en anaérobiose seule. Plusieurs métabolites dont certains possèdent une structure ressemblant à des produits de dégradation d'un des deux dinitrophénols ont été mis en évidence. Un autre métabolite a une cinétique d'apparition et des caractéristiques pouvant laisser penser qu'il proviendrait de l'octogène. Les autres métabolites n'ont pas pu être identifiés précisément en raison de la complexité du sédiment. L'apparition de nitrates et de nitrites nous laisse supposer que des molécules nitrées ont été dégradées, produisant ainsi des nitrates et des nitrites entre 60 et 105 jours dans le milieu. De même, l'apparition de sulfates peut être corrélée à la dégradation de molécules soufrées, des sulfonates par exemple. Les quantités de soufre mesurées dans la lagune et de sulfates produits dans le fermenteur soulignent l'importance de molécules organiques soufrées non identifiées, mais potentiellement dégradées dans ces conditions expérimentales.

Parallèlement à l'évolution des concentrations en composés, l'analyse des microorganismes par « FISH » a permis d'effectuer un suivi des populations bactériennes par deux approches différentes. Une approche par familles a permis de mettre en évidence la

prédominance des Archéobactéries et des α -Proteobacteries. Une autre approche plus spécifique a permis d'évaluer plus précisément le rôle de plusieurs genres dans la dégradation des contaminants et ainsi de corrélérer la disparition de certaines molécules avec la présence de genres bactériens spécifiques. Ainsi plusieurs genres peuvent être impliqués dans la dégradation des nitrophénols. Il peut s'agir de *Nitrobacter*, *Nitrosomonas*, *Clostridium*, et *Pseudomonas* qui semblent avoir joué un rôle dans la dégradation du Dinoseb et du Dinoterb. *Pseudomonas* et *Nitrosomonas* sont potentiellement impliqués dans la dégradation de l'hexogène et de l'octogène. De plus, nous pouvons remarquer que *Pseudomonas* étant une bactérie anaérobie facultative, elle peut avoir un rôle lors de la première phase de dégradation anaérobie des nitrophénols et s'adapter à des conditions d'aérobiose pour dégrader les nitramines. Les microorganismes du genre *Nitrosomonas* sont impliqués dans la phase de nitrification (production de NO_2 à partir de NH_4^+) tandis que *Nitrobacter* réalise la nitrification ($\text{NO}_2^- \rightarrow \text{NO}_3^-$). Ces bactéries sont aérobies obligatoires et impliquées dans le cycle de l'azote. On peut donc s'attendre à ce qu'ils jouent un rôle important dans la dégradation des produits nitrés et participer à leur minéralisation.

L'évolution du pH peut également être corrélée à la dégradation des produits. En effet, une première phase anaérobie, correspondant à la dégradation des nitrophénols pourrait à cause des processus fermentaires expliquer la chute du pH dans les 15 premiers jours du fonctionnement du réacteur. Une deuxième phase, plus contrôlée par des processus se déroulant en aérobiose, et correspondant à la dégradation de l'hexogène pourrait expliquer la remontée de pH entre 20 et 35 jours. En effet des composés comme le MEDINA (méthylènedinitramine), riche en fonctions amines pourraient participer à la remontée du pH et inhiber le développement de certains germes, jusqu'à ce qu'ils soient dégradés. Le plateau de pH observé entre 35 et 60 jours peut correspondre à une période de latence ou de dégradation des métabolites de l'hexogène. La dégradation de l'octogène entre 60 et 80 jours va de nouveau entraîner la production d'amines pouvant expliquer une légère réaugmentation du pH.

Nous avons pu ainsi constater la présence de différentes familles de microorganismes qui cohabitent et se succèdent durant le fonctionnement des réacteurs. Des consortiums bactériens différents peuvent donc être à l'origine de la disparition progressive de différentes molécules.

L'utilisation de marqueurs radioactifs a été réalisée dans le but d'observer des métabolites issus de la dégradation des composés organiques. L'ajout de ^{14}C -hexogène dans un réacteur ayant déjà atteint le temps final n'a pas été suivi d'une dégradation significative

de l'hexogène. En revanche, l'ajout de [^{14}C]-TNT et de [^{14}C]-hexogène sur un réacteur relancé à $t=0$ a été suivi de la consommation de 100% du TNT ajouté en 24h tandis que l'hexogène est consommé plus lentement jusqu'à 80%. Ces résultats laissent fortement supposer que des consortiums adaptés aux molécules doivent être présents pour envisager leur dégradation. Si les composés principaux semblent être dégradés, la présence de quelques métabolites persistants dans le temps a pu être observée. La radioactivité dosée sur la pouzzolane montre qu'il n'y aurait pas d'adsorption sur cette dernière et donc confirmerait la minéralisation d'une grande partie des contaminants. Des expériences complémentaires vont être réalisées afin d'identifier plus précisément ces métabolites. De plus, de nouvelles expériences en réacteur vont être réalisées avec de l'hexogène radiomarqué afin de doser le CO_2 issu de l'hexogène.

Des paramètres pourraient être ajustés afin d'optimiser le fonctionnement du pilote. En effet, il serait intéressant de tester d'autres dimensions du réacteur afin d'observer l'impact du diamètre de la colonne, de la hauteur du lit fixé, d'un autre substrat que l'amidon, sur la dégradation des composés. Un suivi et une régulation du pH et du potentiel redox pourraient être effectués dans chaque compartiment. Des prélèvements pourraient être effectués dans tous les compartiments. Une colonne de plus grande taille pourrait permettre d'effectuer des prélèvements à plusieurs niveaux à l'intérieur du réacteur. Si ces prélèvements peuvent aider à la compréhension des bactéries responsables de la dégradation, ils multiplient les échantillons et augmentent considérablement le coût de l'expérience.

Il serait intéressant de travailler sur des pilotes à plus grande échelle (plusieurs mètres cube) mettant en jeu une quantité de sédiment plus importante. Néanmoins, le risque pyrotechnique étant très important, la sécurité des essais doit être contrôlée. Des enrichissements et des conditions contrôlées mettant en jeu les microorganismes pourraient alors être envisagés par ordre chronologique de dégradation des molécules nitrées. Un suivi et une régulation du pH, associés à une complémentation en continu des minéraux permettraient ainsi d'optimiser la dégradation. Tout d'abord, des conditions anaérobies pourraient favoriser les bactéries telles que *Pseudomonas* ou *Leclercia*, stimulant ainsi la dégradation des nitrophénols. Par la suite, une phase d'aérobie poussée pourrait permettre de dégrader l'hexogène puis l'octogène.

L'ajout de bactéries répertoriées pour avoir un potentiel de dégradation peut également se révéler efficace. Si ces bactéries sont déjà dans la lagune, elles ne présentent a priori pas de danger pour l'écosystème environnant. Dans le cas contraire, il est nécessaire d'effectuer une

surveillance du milieu afin de ne pas déclencher de perturbation de l'équilibre de l'écosystème. Notre étude a permis d'identifier plusieurs souches capables de dégrader les nitrophénols. Si ces souches sont utilisables commercialement, il serait intéressant de les ajouter au milieu, en adaptant le milieu nutritif et les conditions physico-chimiques.

Des approches sur le terrain peuvent également être envisagées même si les opportunités de remédiation sur site sont réduites en raison des normes de sécurité à l'intérieur du site.

Une approche peut être envisagée en excavant la boue de la lagune, et en la traitant dans l'enceinte de l'usine mais sur une parcelle sécurisée. Le niveau des eaux stagnantes de la lagune est dépendant du niveau des précipitations ainsi que de la période de l'année. Par conséquent, une partie de ces eaux de déchet pourrait être pompée. Le pH ainsi que la composition en éléments nutritifs de cette eau de déchets pourraient être ajustés et servir directement à alimenter le réacteur en nutriments. La boue pourrait être ainsi plus facilement excavée et déplacée sur une plate-forme où seraient aménagées des cuves qui serviraient de réacteurs. Un système d'aération, activé après la dégradation des nitrophénols, pourrait être installé dans la cuve à travers le sédiment. Des mélangeurs pourraient également être installés à mi hauteur à l'intérieur des cuves afin de remuer le sédiment périodiquement. Des prélèvements pourraient être effectués à intervalles réguliers afin de doser les composés organiques et adapter l'aération et le milieu nutritif.

Un des principaux objectifs du projet était de supprimer le risque pyrotechnique présent dans la boue chargée en quantités importantes. Les essais de bioremédiation en réacteur semblent permettre de supprimer ce risque, puisque la majorité des explosifs sont transformés par ce procédé. Des tests de toxicité doivent encore être réalisés sur plantes. Ces tests permettront de comparer la toxicité de la boue décontaminée avec la boue initiale. Nos travaux rendent possible l'utilisation de plantes pour finir d'épurer les effluents issus du réacteur.

Ainsi ces travaux ont permis de mettre en évidence l'immense potentiel qu'ont les microorganismes en terme de bioremédiation et leur efficacité dans les processus de dépollution. Même s'il s'agit, comme dans notre cas, de boues particulièrement riches en contaminants organiques, ces travaux soulignent l'efficacité des procédés biologiques, peu coûteux financièrement et énergétiquement. Toutefois, il ne s'agit que d'une étude en laboratoire, et pour développer un pilote industriel, un grand nombre d'étapes doivent encore

être franchies. L'enjeu pour l'environnement est important, puisque beaucoup de sites industriels du même ordre existent en Europe, ainsi que dans de nombreux pays en voie de développement. Ce procédé s'il est mis en œuvre restera peu coûteux en regard des procédés physiques et permettra d'envisager le traitement des sites à moindre coût pour les entreprises et pour l'environnement. Malgré tout, s'agissant de procédés biologiques, une étude préalable pour chaque site sera requise de manière à déterminer la capacité des germes endogènes à consommer les produits.

PARTIE III Bibliographie

ADEME (Agence de l'Environnement et de la Maitrise de l'Energie). 2004. Ecotoxicité des sols et des déchets. Résultats des tests biologiques. Données et références. 96p. ADEME editions.

ADEME. www.ademe.fr Sites pollués et sols.

ADRIAN, N.R., ARNETT, C.M., HICKEY, R.F. 2003. Stimulating the anaerobic biodegradation of explosives by addition of hydrogen or electron donors that produce hydrogen. *Water res.* 37 : 3499-3507.

AGRAWAL, J.P., HODGSON, R.D. 2007. Organic Chemistry of Explosives. John Wiley Eds. England. 384p.

AJITHKUMAR, B., AJITHKUMAR, V.P., IRIYE, R. 2003. Degradation of 4-amyphenol and 4-hexylphenol by a new activated sludge isolate of *Pseudomonas veronii* and proposal for new subspecies status. *Res. Microbiol.* 154 : 17-23.

ARGESE, E., BETTIOL, C., MARCHETTO, D., DE VETTORI, S., ZAMBON, A., MIANA, P., GHETTI P.F. 2005. Study on the toxicity of phenolic and phenoxy herbicides using the submitochondrial particle assay. *Toxicology in Vitro.* 19 : 1035-1043.

BACHMANN, W., SHEEHAN, J.C. 1949. A new method of preparing the high explosive RDX. *J Am chem soc.* 71 : 1842-1845.

BALLERINI, D., GATELLIER, C., VOGEL, T., 1998. Techniques de traitement par voie biologique. Ademe Editions. Angers. 247p.

BARRIUSO E., CALVET R., SCHIAVON M. ET SOULAS G. 1996 - Les pesticides et les polluants organiques des sols. Transformations et dissipation. Etude Gestion Sols, 3 : 279-296.

BAZOOBANDI, M., YADURAJU N.T., KULSHRESTHA, G. 2000. Analysis of flufenacet in soil, wheat grain and straw by gas chromatography. *J Chromatogr A.* 886 : 319-322.

BELLER, H.R., TIEMER, K. 2002. Use of liquid chromatography/tandem mass spectrometry to detect distinctive indicators of in situ RDX transformation in contaminated groundwater. *Environ Sci Technol.* 36 : 2060-2066.

BENTLEY, R.E., LEBLANC, G. A., HOLLISTER, T. A., SLEIGHT, B.H. (1977). Acute toxicity of 1,3,5,7-tetranitro-octahydro-1,3,5,7-tetrazocine (HMX) to aquatic organisms. Washington: U.S. Army Medical Research and Development Command.

BERTHE CORTI, L., JACOBI, H., KLEIHAUER, S., WITTE, I. 1998. Cytotoxicity and mutagenicity of a 2,4,6 trinitrotoluene (tnt) and hexogen contaminated soil in s. typhimurium and mammalian cells. *Chemosphere.* 37 : 209-218.

BEULKE, S., MALKOMES, H.P. 2001. Effects of the herbicides metazachlor and Dinoterb on the soil microflora and the degradation and sorption of metazachlor under different environmental conditions. *Biol Fertil Soils.* 33 : 467-471.

BINKS, P-R., NICKLIN, S., BRUCE, N.C. 1995. Degradation of Hexahydro-1,3,5-Trinitro-1,3,5-Triazine (RDX) by *Stenotrophomonas maltophilia* PB1. *Appl Environ Microbiol.* 61 : 1318-1322.

BIOGENIE INC. 1994. Profil d'entreprise. Ste-Foy, QC, 1

BOOPATHY, R. 2000. Bioremediation of explosives contaminated soils. *Int Biodeter Biodeg.* 46 : 29-36.

BOOPATHY, R. 2002. Effect of food-grade surfactant on bioremediation of explosives-contaminated soil. *J Hazard Mater.* 92 : 103-114.

BRUNJES, K. J., SEVERT, S. A., LIU, J., PAN, X., BRAUSCH, J., COX, S., COBB, G. P., MCMURRY, S. T., KENDALL, R. J., SMITH, P. N. 2007. Effects of HMX exposure on reproduction and hatchling development in northern bobwhite quail. *J Toxicol Env Heal.* 70 : 682-687.

CASTILLO, M.A., FELIS, N., ARAGO, P , CUESTA, G., SABATER, C. 2006. Biodegradation of the herbicide diuron by streptomycetes isolated from soil. *Int Biodeter Biodeg.* 58 : 196–202.

CHEVRE, N. 2000. Etude et modélisation des effets écotoxiques d'un micropolluant organique sur *daphnia magna* et *pseudokirchneriella subcapitata*. 206p. Lausanne.

CHOLAKIS, J., WONG, L., VAN GOETHEM, D., MINOR, J., SHORT, R. 1980. Mammalian toxicological evaluation of RDX. US Army Research and Development Command, Fort Detrick, Frederick, MD, USA, Document no. NTIS/AD-A092-531/3.

COMFORT, S. 2006. Remediating RDX and HMX contaminated soil and water. In: *Bioremediation of Aquatic and Terrestrial Ecosystems*, pp. 263-310.

CUTHBERT, J. A., D'ARCY-BURT, K. J., CARR, S. M. A. 1985. HMX: acute toxicity tests in laboratory animals. AD-A171 598. U.S. Army Medical Research and Development Command, Fort Detrick, MD (cited in ATSDR Toxicological Profile for HMX).

DEVAULT, D., MERLINA, G., LIM, P., PROBST, J.-L., PINELLI, E. 2007. Multi-residues analysis of pre-emergence herbicides in fluvial sediments: application to the Mid-Garonne river. *J environ monitor.* 9 : 1009-1017.

ESCHER, B. 1995. The Relationship between Membrane-Water Partitioning Uncoupling, and Inhibitory Activity of Substituted Phenols in Chromatophores of *Rhodobacter Sphaeroides*. Zürich.

ESTEVE-NUNEZ, A., LUCCHESI, G., PHILIPP, B., SCHINK, B., RAMOS J.L. 2000. Respiration of 2,4,6-Trinitrotoluene by *Pseudomonas* sp. Strain JLR11. *J Bact.* 182 : 1352–1355.

ESTEVE-NUNEZ, A., CABALLERRO, A., RAMOS, J.L. 2001. Biological Degradation of 2,4,6-Trinitrotoluene. *Microbiol Mol Biol R.* 65 : 335-352.

EXTOXNET. 1999. <http://ace.orst.edu/info/extoxnet/ghindex.html>.

FARELL A., QUILTY B. 2002. The enhancement of 2-chlorophenol degradation by a mixed microbial community when augmented with *Pseudomonas putida* CP1. *Water Res.* 36 : 2443-2450.

FERNANDO, T., AUST, S.D. 1990. Biodegradation of munition waste, TNT (2,4,6-trinitrotoluene), and RDX (hexahydro-1,3,5-trinitro-1,3,5-triazine) by *Phanerochaete chrysosporium*. *Emerging Technologies in Hazardous Waste Management II*, Tedder, D. W., and Pohland, F. G., eds., American Chemical Society, Washington, D.C., 214-232.

FERRARI, B.C., BINNERUP, S.J., GILLINGS, M. 2005. Microcolony cultivation on a soil substrate membrane system selects for previously uncultured soil bacteria. *Appl Environ Microbiol.* 71 : 8714–8720.

FIALA, E. S. 1977. Investigations into the metabolism and mode of action of the colon carcinogens 1,2-Dimethylhydrazine and azoxymethane. *Cancer*, 40 : 2436-2445.

FINKEL, A.J. 1983. Herbicides: Dinitrophenols. In: Hamilton and Hardy's Industrial Toxicology, 4th ed. Boston: John Wright PSG, Inc.pp. 301-2.

FROSLIE, A., KARLOG, O. 1970. Ruminal metabolism of DNOC and DNBP. *Acta Vet. Scand.* 11 : 114-132.

FUNK, S.B., ROBERTS, D.J., CRAWFORD, D.L., CRAWFORD, R.L. 1993. Initial-phase optimisation for bioremediation of munition compound-contaminated soils. *Appl Environ Microbiol.* 59 : 2171–2177.

GASIEWICZ, T.A., 1991. Nitro compounds and related phenolic pesticides. In: Hayes, W.J., Lawes, E.R. (Eds.), Handbook of Pesticides Toxicology, vol. 3. Academic Press, San Diego, pp. 1191–1269.

GOGAL, R.M., JOHNSON, M.S., LARSEN, C.T., PRATER, M.R., DUNCAN, R.B., WARD, D.L., LEE, R.B., SALICE, C.J., JORTNER, B. HOLLADAY, S.D. 2003. Dietary oral exposure to 1,3,5-trinitro-1,3,5-triazine in the northern bobwhite (*Colinus virginianus*). *Env Toxicol Chem.* 22 : 381-387.

GONÇALVES, C., ALPENDURADA, M.F. 2005. Assessment of pesticide contamination in soil samples from an intensive horticulture area, using ultrasonic extraction and gas chromatography–mass spectrometry. *Talanta.* 65 : 1179–1189.

GRIEST, W. H., STEWART, A. J., TYNDALL, R. L., CANTON, J. E., HO, C. H., IRONSIDE, K. S., CALDWELL, W. M., TAN, E. L. 1993. Chemical and toxicological testing of composted explosives-contaminated soil. *Environ.Toxicol. Chem.* 12 : 1105-1116.

GROOM, C.A., HALASZ, A., PAQUET, L., THIBOUTOT, S., AMPLEMAN, G., HAWARI, J., 2005. Detection of nitroaromatic and cyclic nitramine compounds by cyclodextrin assisted capillary electrophoresis quadrupole ion trap mass spectrometry. *J Chromatogr A.* 1072 : 73-82.

HALASZ, A., GROOM, C., ZHOU, E., PAQUET, L., BEAULIEU, C., DESCHAMPS, S., CORRIVEAU, A., THIBOUTOT, S., AMPLEMAN, G., DUBOIS, C., HAWARI, J. 2002. Detection of explosives and their degradation products in soil environments. *J Chromatogr A*. 963 : 411-418.

HAMMILL, T.B., CRAWFORD, R.L. 1996. Degradation of 2-sec-butyl-4,6-dinitrophenol (dinoseb) by *Clostridium bifermentans* KMR-1. *Appl Environ Microbiol*. 62 : 1842-1846.

HAWARI, J., BEAUDET, S., HALASZ, A., THIBOUDOT, S., AMPLEMAN, G. 2000. Microbial degradation of explosives : biotransformation versus mineralization. *Appl Microbial Biotechnol*. 54 : 605-618.

HAWXBY, K., TUBEA, B., OWNBY, J., BASLER, E. 1977. Effects of various classes of herbicides on four species of algae. *Pestic Biochem Phys*. 7 : 203-209.

HERNANDEZ, D., ROWE, J.J. 1987. Oxygen regulation of nitrate uptake in denitrifying *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl Environ Microbiol*. 53, 745-750.

HIS, E., HEYVANG, I., GEFFARD, O., MONTAUDOUIN, X. 1999. A comparison between oyster (*Crassostrea gigas*) and sea urchin (*Paracentrotus lividus*) larval bioassays for toxicological studies. *Water Res*. 33 : 1706-1718.

HONEYCUTT, M.E., JARVISN, A.S., MACFARLAND, V.A. 1996. Cytotoxicity and mutagenicity of 2,4,6-trinitrotoluene and its metabolites. *Ecotox Environ Safe*. 35 : 282-287.

HUMPHREY, S.B., SMOAK, D.R. 1960. Procédés de nitration d'hydrocarbures aromatiques. Brevet d'invention 1.213.939.

IFEN, 2004. Rapport de l'Institut Français de l'Environnement (IFEN) sur « Les pesticides dans les eaux », publié en 2004 sur l'état des lieux en 2002.

JACQUES, R.J., SANTOS, E.C., BENTO, F.M., PERALBA, M.C., SELBACH, P.A., SA, E.L., CAMARGO, F.A. 2005. Anthracene biodegradation by *Pseudomonas* sp. Isolated from a petrochemical sludge landfarming site. *Int Biodeter Biodegr*. 56 : 143-150.

JANG, A., OKABE, S., WATANABE, Y., KIM, I.S., BISHOP, P.L., 2005. Measurement of growth rate of ammonia oxidizing bacteria in partially submerged rotating biological contactor by fluorescent in situ hybridization (FISH). *J Environ Eng Sci*. 4 : 413-420.

JENKINS, T.F., WALSH, M.E., SCHUMACHER, P.W., MIYARES, P.H., BAUER, C.F., GRANT, C.L. 1989 J. AOAC 72 : 890.

JENKINS, T.F., BARTOLINI, C., RANNEY T. A. 2003. Stability of CL-20, TNAZ, HMX, RDX, NG, and PETN in Moist, Unsaturated Soil. US Army Corps of Engineers Engineer Research and Development Center.

JOHNSON, M.S., PAULUS, H.I., SALICE, C.J., CHECKAI, R.T., SIMINI, M. 2004. Toxicologic and histopathologic response of the terrestrial salamander *Plethodon cinereus* to soil exposures of 1,3,5-trinitrohexahydro-1,3,5-triazine. *Arch Environ Con Tox*. 47 : 496-501.

KAAKE, R.H., ROBERTS, D.J., STEVENS, T., CRAWFORD, R.L., CRAWFORD, D.L. 1994. Bioremediation of Soils Contaminated with the Herbicide 2-sec-Butyl-4,6-Dinitrophenol (Dinoseb). *Appl Environ Microbiol.* 58 : 1683-1689.

KARG, F. 2001. Pollutions par les pesticides et leurs métabolites - Sites pollués à l'échelle supérieure. *Environnement & Technique* n°209.

KHLEIFAT, K.M. 2006. Biodegradation of linear alkylbenzene sulfonate by two-member facultative anaerobic bacterial consortium. *Enzyme and Microbial Technology* 7162.

KULKARNI, M., CHAUDHARI, A. 2006. Biodegradation of *p*-nitrophenol by *Pseudomonas putida*. *Biores Technol.* 97, 982-988.

KURT, TL, ANDERSON, R, PETTY, C. 1986. Dinitrophenol in weight loss: The poison center and public safety. *Vet Hum Toxicol.* 28:574-5.

LEADBETTER, J.R. 2003 Cultivation of recalcitrant microbes: cells are alive, well and revealing their secrets in the 21st century laboratory. *Curr Opin Microbiol.* 6, 274-281.

LECOMTE, R 1998. Les sites pollués. Traitement des sols et des eaux souterraines. Lavoisier Tec et Doc, Ed DUNOD. Paris. 204p.

LEGRAND, C., SOLERIEU, M., GOGLIO, E. Traitement des sites et des sols pollués. Territorial Editions. Voiron. 85p.

LIGHT, W.C., WILBER G.G., CLARKSON W.W.. 1997. Biological treatability of RDX-contaminated soil. p. 135–148. *In* J.E. Alleman (ed.) 52nd Purdue Ind. Waste Conf. Proc., West Lafayette, IN. May 1997. Lewis Publ., New York.

LIU, D.H., SPANGGORD, R.J., BAILEY, H.C., JAVITZ, H.S., JONES, D.C.L. 1983 Toxicity of TNT wastewaters to aquatic organisms. SRI International. Menlo Park, CA.

LOVLEY, D.R., BAEDECKER, M.J., LONERGRAN, D.J., COZARELLI, I.M., PHILLIPS, E.J.P., SIEGEL, D.I. 1989. Oxidation of aromatic contaminants coupled to microbial iron reduction. *Nature.* 339 : 297-299.

LOVLEY, D.R., WOODWARD, J.C., CHAPELLE, F.H. 1994. Stimulated anoxic biodegradation of aromatic hydrocarbons using Fe(III) ligands. *Nature.* 370 : 128-131.

MARTINS, J.M., MERMOUD, A. 1998. Sorption and degradation of four nitroaromatic herbicides in mono and multi-solute saturatedunsaturated soil batch systems. *Journal of Contaminant Hydrology.* 33 : 187–210.

MATE. 1996 . Ministère de l'Aménagement du Territoire et de l'Environnement

MEESTERS, R.J.W., SCHRODER, H.F. 2002. Simultaneous Determination of 4-Nonylphenol and Bisphenol A in Sewage Sludge. *Anal Chem.* 74 : 3566-3574.

MILLER, R. Phytoremediation. Technology Overview Report, GWRTAC Series, octobre 1996.

MONNIG, E., ZWEIDINGER R. A. 1980. Treatability studies of pesticide manufacturing wastewaters: dinoseb and atrazine. U.S. Environmental Protection Agency technical report no. 600/2-80- 077c. U.S. Environmental Protection Agency, Washington, D.C.

MOTER, A., GOBEL, U.B. 2000. Fluorescence in situ hybridization (FISH) for direct visualization of microorganisms. *J Microbiol Methods*. 41 : 85–112.

MOUTAOUAKKIL, A., ZEROUAL, Y, DZAYRI, F.Z., TALBI, M., LEE, K., BLAGHEN, M. 2003. Purification and partial characterization of azoreductase from *Enterobacter agglomerans*. *Arch Biochem Biophys*. 413 : 139-146.

MUKHI, S., PAN, X., COBB, G.P. PATIÑO, R. 2005. Toxicity of hexahydro-1,3,5-trinitro-1,3,5-triazine to larval zebrafish (*Danio rerio*). *Chemosphere* 61 : 178-185.

MYLER, C. A., SISK, W. 1991 Bioremediation of explosives contaminated soil (scientific questions/engineering realities). In *Environmental Biotechnology for Waste Treatment*, eds G. S. Sayler, R. Fox and J. W. Blackburn. pp. 137-146. Plenum Press, New-York.

NAM, I.H., CHANG, Y.S., HONG, H.B., LEE, Y.E. 2003 A novel catabolic activity of *Pseudomonas veronii* in biotransformation of pentachlorophenol. *Appl Microbiol Biotechnol*. 62 : 284-290.

OH, S.Y., CHAD, K., CHIU, P.C. 2004. Conceptual comparison of pink water treatment technologies : granular activated carbon, anaerobic fluidized bed, and zero-valent iron-Fenton process. *Wat Sci Technol*. 49 : 129-136.

O'NEILL, H. J., POLLOCK, H. S. BAILEY, P. MILBURN, C. GARTLEY RICHARDS, J. E. 1989. Dinoseb presence in agricultural subsurface drainage from potato fields in northwestern New Brunswick, Canada. *Bull. Environ. Contam.Toxicol*. 43 : 935–940.

PAN, X., ZHANG, B., COBB, G.P. 2005. Extraction and analysis of trace amounts of cyclonite (RDX) and its nitroso-metabolites in animal liver tissue using gas chromatography with electron capture detection (GC-ECD). *Talanta*. 67 : 816-823.

PAN, X., ZHANG, B., COX, S. B., ANDERSON, T.A., COBB, G.P. 2006. Determination of N-nitroso derivatives of hexahydro-1,3,5-trinitro-1,3,5-triazine (RDX) in soils by pressurized liquid extraction and liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry. *J Chromatogr A*. 1107 : 2-8.

PILON-SMITS, E. 2005. Phytoremediation. *Annual Review of Plant Biology*. 56 : 15-39.

PONT, V., COLLET G.F. 1983. Pénétration, translocation et métabolisme de dinitrophénols. *Weed Research*. 24 : 239–247.

QUINCHON, J. 1982, Les explosifs, Ed. Technique et Documentation Lavoisier, Tome 1, 158-166.

RAMOS, L., KRISTENSON, E.M., BRINKMAN, U.A.T. 2002. Current use of pressurised liquid extraction and subcritical water extraction in environmental analysis. *J Chromatogr A*. 975 : 3-29.

RAMOS, J.L., GONZALEZ-PEREZ, M.M., CABALLERO, A., VAN DILLEWIJN, P. 2005. Bioremediation of polynitrated aromatic compounds: plants and microbes put up a fight. *Curr Opinion Biotechnol*. 16 : 275-281.

RICHARD, C. 1989. New Enterobacteriaceae found in medical bacteriology *Moellerella wisconsensis*, *Koserella trabulsii*, *Leclercia adecarboxylata*, *Escherichia fergusonii*, *Enterobacter asbutiae*, *Rahnella aquatilis*. *Ann Biol Clin* 47 : 231-236.

ROBIDOUX, P.Y., HAWARI, J., THIBOUDOT, S., AMPLEMAN, G., SUNAHARA, G.I. 2001. Chronic toxicity of octahydro-1,3,5,7-tetranitro-1,3,5,7-tetrazocine (HMX) in soil determined using the earthworm (*Eisenia andrei*) reproduction test. *Environ Pollut*. 111 : 283-292.

ROBIDOUX, P. Y., J. HAWARI, BARDAI, G., PAQUET, L., AMPLEMAN, G., THIBOUTOT, S. SUNAHARA, G. I. 2002. "TNT, RDX, and HMX decrease earthworm (*Eisenia andrei*) life-cycle responses in a spiked natural forest soil." *Arch Environ Contam Toxicol*. 43 : 379-88.

ROBIDOUX, P.Y., GONG, P., SARRAZIN, M., BARDAI, G., PAQUET, L., HAWARI, J. DUBOIS, C. SUNAHARA, G.I. 2004. Toxicity assessment of contaminated soils from an antitank firing range. *Ecotox Environ Safe*. 58 : 300-313.

ROSEN, G., LOTUFO, G.R.. 2007. Bioaccumulation of explosive compounds in the marine mussel, *Mytilus galloprovincialis*. *Ecotox Environ Safe*. 68 : 237-245.

ROWELL, D.L. 1981. The chemistry of soil processes. Edité par D. J. Greenland et M. H. R. Have. John Wiley & Son\ Ltd. 714p.

SARMA P.M., BHATTACHARYA.D, KRISHNAN S., LAL B. 2004. Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by a newly discovered enteric bacterium, *Leclercia adecarboxylata*. *Appl Environ Microbiol*. 70 : 3163-3166.

SAWICKI, B., DURAND, G., DEWITTE, J.D., RATANASAVANH, D., RICHE, C., LEGLISE, M.C. 1998. Myelosuppressive activity of two herbicides, atrazine and dinoterb, on human haematopoietic progenitor cells: An in vitro assay to evaluate the effects of intermediate or long-term exposure. *Toxicol. In Vitro*. 12 : 183-190.

SENTHIL, F., KUMAR, K., KANNAN, K., GIESY, J.P., MASUNAGA, S. 2002. Distribution and Elimination of Polychlorinated Dibenzo-p-dioxins, Dibenzofurans, Biphenyls, and p,p'-DDE in Tissues of Bald Eagles from the Upper Peninsula of Michigan. *Environ Sci Technol*. 36 : 2789-2796.

SIMINI, M., WENTSEL, R.W., CHECKAI, R., PHILLIPS, C., CHESTER, N.A., MAJOR, M.A., AMOS, J.C. 1995. Evaluation of soil toxicity at Joliet army ammunition plant. *Environ Tox Chem*. 14 : 623-630.

SMOCK, L.A., STONEBURNER, D.L., CLARK, J.R. 1976. The toxic effects of trinitrotoluene (TNT) and its primary degradation products on two species of algae and the fathead minnow. *Water Res.* 10 : 537-543

SNELLINX, Z., NEPOVIM, A., TAGHAVI, S., VANGRONSVELD, J., VANEK, T. VAN DER LELIE, D. 2002. Biological remediation of explosives and related nitroaromatic compounds. *Environ Sci Pollut R.* 9 : 48-61

SPACK, L. 1997. Utilisation du CO₂ supercritique pour l'extraction de résidus de pesticides nitroaromatiques dans les sols. Lausanne.

SPAIN, J.C., 1995. Biodegradation of nitro-aromatic compounds. *Annu Rev Microbiol.* 49 : 523–555.

SPANGLER, W.J., GILMOUR, C.M. 1966. Biochemistry of nitrate respiration in *Pseudomonas stutzeri*. *J Bacteriol.* 91 : 245-250.

SPANGGORD, R.J., GIBSON, B.W., KECK, R.G., THOMAS, D.W. 1982. Effluent analysis of wastewater generated in the manufacture of 2,4,6-trinitrotoluene. 1. Characterization study. *Environ Sci Technol.* 16 : 229-232.

STAEMPFLI, C., TARRADELLAS, J., BECKER-VAN SLOOTEN K. 2007. Effects of dinoseb on energy reserves in the soil arthropod *Folsomia candida*. *Ecotox Environ Safe.* 68 : 263–271.

STATION FEDERALE DE RECHERCHES EN ARBORICULTURE, VITICULTURE ET HORTICULTURE. 2002. Produits phytosanitaires. Wädenswil, Switzerland.

STIPA, 2000. Système de Transfert de l'Information Pédologique et Agronomique. Unité Sols et Environnement. INRA Montpellier.

TACHON, R., PICHON, V., BARBE LE BORGNE, M., MINET, J-J. 2007. Use of porous graphitic carbon for the analysis of nitrate ester, nitramine and nitroaromatic explosives and by-products by liquid chromatography–atmospheric pressure chemical ionisation-mass spectrometry. *J Chromatogr A.* 1154, 174–181.

TALMAGE, S.S., OPRESKO, D.M., MAXWELL, C.J., WELSH, C.J.E., CRETILLA, F.M., RENO, P.H. 1999 Nitroaromatic munition compounds: environmental effects and screening values. *Rev. Environ. Contam. Toxicol.* 161, 1-156.

TIEDJE, J. M., A. J. SEXSTONE, T. B. PARKIN, N. P. REVSBECH, AND D. R. SHELTON. 1984. Anaerobic processes in soil. *Plant Soil.* 76:197-212.

UNEP, 2006. PIC Circular XXIII—June 2006. Rotterdam Convention, United Nations Environment Programme, Geneva, Switzerland, pp. 110–114.

US EPA. 1976. Water quality criteria. Washington, DC: US Environmental Protection Agency.

US EPA, 1993. IRIS : Hexahydro-1,3,5-trinitro-1,3,5-triazine (RDX). Office of Health and Environmental Assessment. Cincinnati, OH.

VIAANT, M.R., PINCETICH, C.A., HINTON, D.E., TJEERDEMA, R.S. 2006. Toxic actions of Dinoseb in medaka (*Oryzias latipes*) embryos as determined by in vivo ^{31}P NMR, HPLC-UV and ^1H NMR metabolomics. *Aquat Toxicol* 76, 329-342.

VIDALI, M. 2001. Bioremediation. An overview. *Pure Appl. Chem.* 73 : 1163-1172.

VILA, M. 2006. Utilisation de plantes agronomiques et lacustres dans la dépollution des sols contaminés par le RDX et le TNT : approches en laboratoire. 204 p. TOULOUSE.

VRIONIS, H.A., ANDERSON, R.T., ORTIZ-BERNAD, I., O'NEILL, K.R., RESCH, C.T., PEACOCK, A.D., DAYVAULT, R., WHITE, D.C., LONG, P.E., LOVLEY, D.R. 2005. Microbiological and geochemical heterogeneity in an in situ uranium bioremediation field site. *Appl Environ Microbiol.* 71 : 6308–6318.

WILCKE, W., KRAUSS, M., AMELUNG, W. 2002. Carbon Isotope Signature of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs): Evidence for Different Sources in Tropical and Temperate Environments. *Environ. Sci. Technol.* 36 : 3530-3535.

WILLIAMS, R.T., ZIEGANFUSS, P.S., AND SISK, W.E. 1992. Composting of explosives and propellant contaminated soils under thermophilic and mesophilic conditions. *J. Ind. Microbiol.* 9 : 137–144.

ZHANG, B., PAN, X., COBB, G.P., ANDERSON, T.A. 2005. Use of pressurized liquid extraction (PLE)/gas chromatography-electron capture detection (GC-ECD) for the determination of biodegradation intermediates of hexahydro-1,3,5-trinitro-1,3,5-triazine (RDX) in soils. *J Chromatogr B.* 824 : 277-282.

ZHANG, B., FREITAG, C.M., CAÑAS, J.E., CHENG, Q., ANDERSON, T.A. 2006. Effects of hexahydro-1,3,5-trinitro-1,3,5-triazine (RDX) metabolites on cricket (*Acheta domesticus*) survival and reproductive success. *Environ Pollut.* 144 : 540-544.

PARTIE IV Annexes

Annexe I : Caractéristiques physico-chimiques des produits étudiés

	Hexogène	Octogène	TNT	Dinoseb	Dinoterb
Numéro de CAS (Chemical Abstract Service)	121-82-4	2691-41-0	118-96-7	88-85-7	1420-07-1
Poids Moléculaire(g/mol)	222,26	296,2	227.13	240,2	240,2
Solubilité dans l'eau à 20°C(en mg/L)	42,3	5	130	100	4,5
Point de fusion	205°C	286°C	80,1 °C	Entre 38 et 42°C	125,5
Température d'explosion	260°C	330°C	290°C		
Log K _{ow}	0,81	0,16	1,6	3,69	1,91
pKa				4,62	5

Annexe II : Calcul de la part du carbone issu des effluents industriels

Exemple de calcul pour l'octogène :

Le poids moléculaire de l'octogène est de 296,2 g/mol, il comporte 4 carbones d'où une masse en carbone de 48 g/mol. Le rapport en carbone peut donc être calculé : $R = 296,2 / 48 = 6,17$.

La concentration en octogène déterminée par les analyses est de 53 mg/kg (concentration par kg de sol humide). Cette mesure doit être ramenée à une concentration par kg de sol sec via le pourcentage d'humidité du sédiment (49,4 %, données bureau d'études).

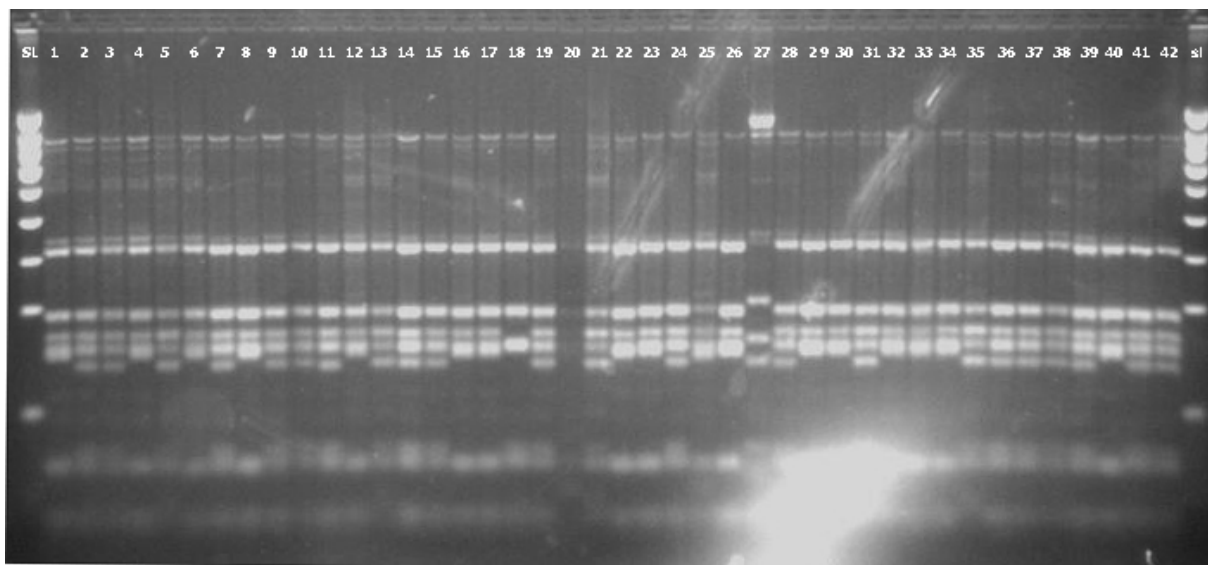
Concentration en octogène = $53 \times 100 / 49,4 = 107,29$ mg/kg.

D'où une masse de carbone apportée par l'octogène = $107,29 / 6,17 = 17,39$ mg.

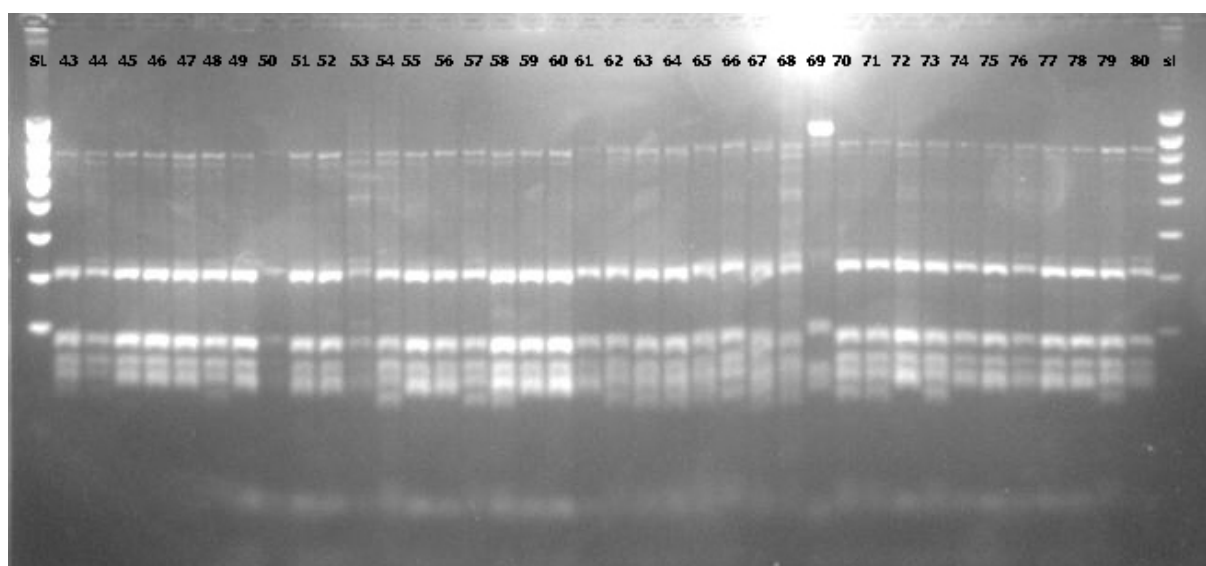
Cette démarche étant réalisée pour chaque produit, une estimation de la quantité de carbone apportée par tous les produits recherchés peut être effectuée pour chaque zone.

Ainsi, la somme de carbone apportée par les produits référencés dans les analyses demandées par l'entreprise dans la zone 3 est de 10,2 g / kg de sol. Or nous trouvons par l'analyse 322g de carbone par kg de sol sec, ce qui équivaut à 97 % de carbone dont l'origine reste indéterminée.

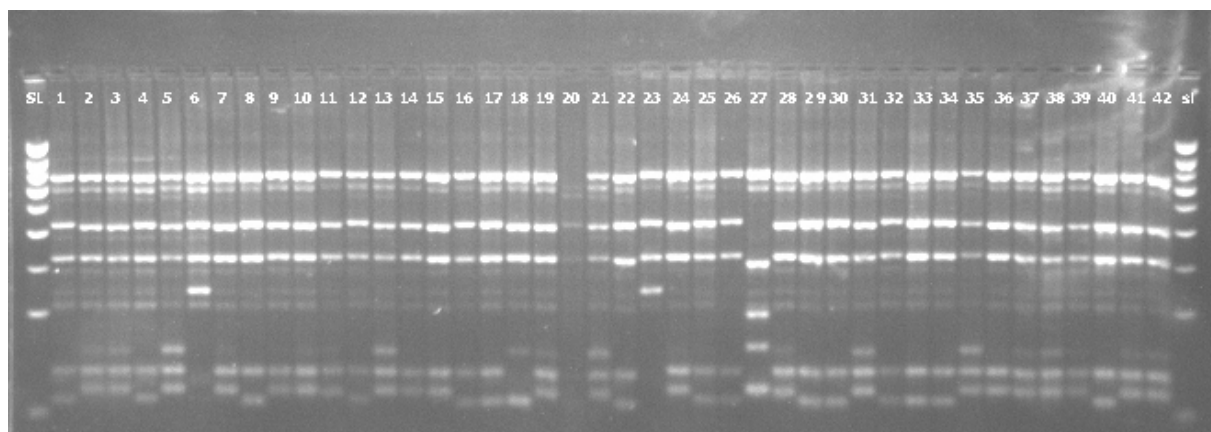
Annexe III : Profils RFLP



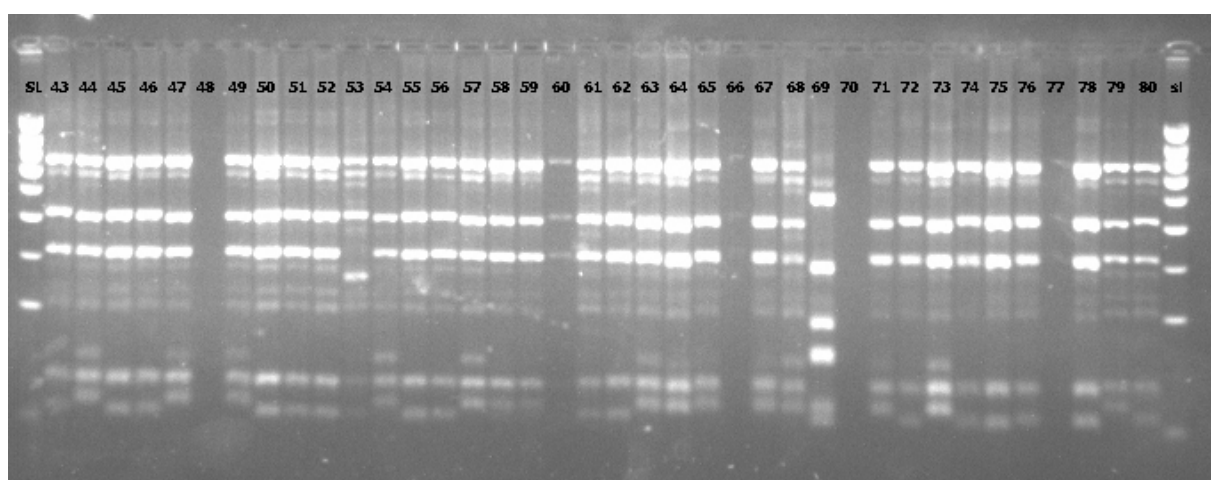
Gel Digestion AA4 HaeIII, puits 1 à 42.



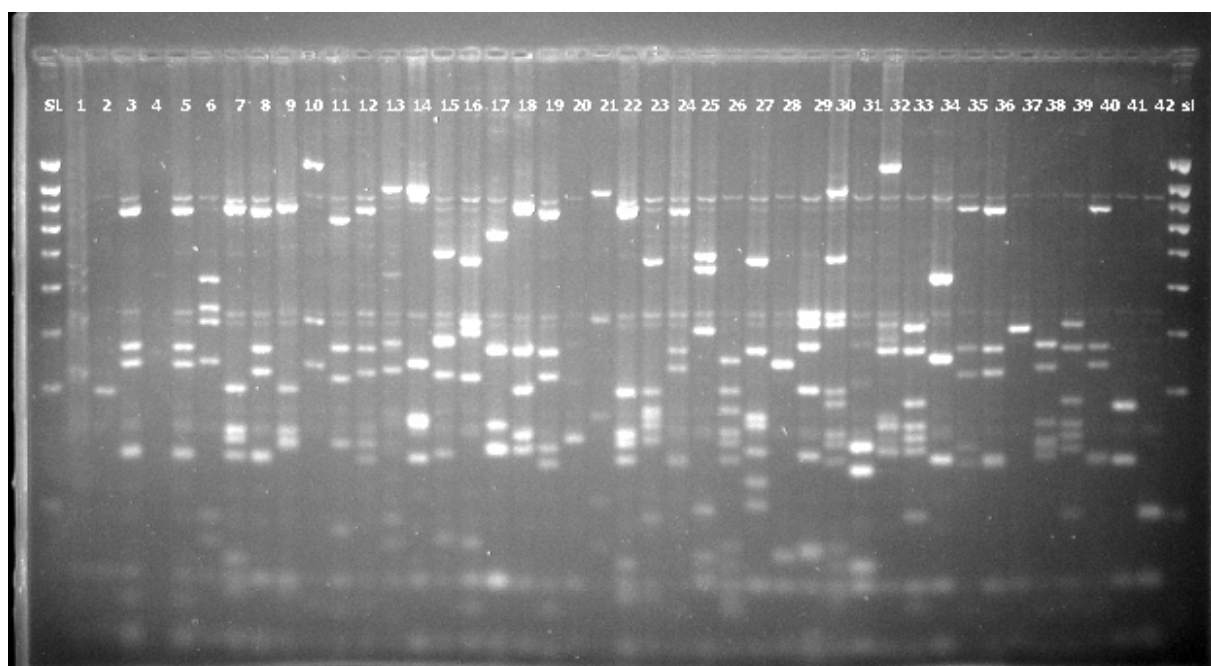
Gel Digestion AA4 HaeIII, puits 43 à 80.



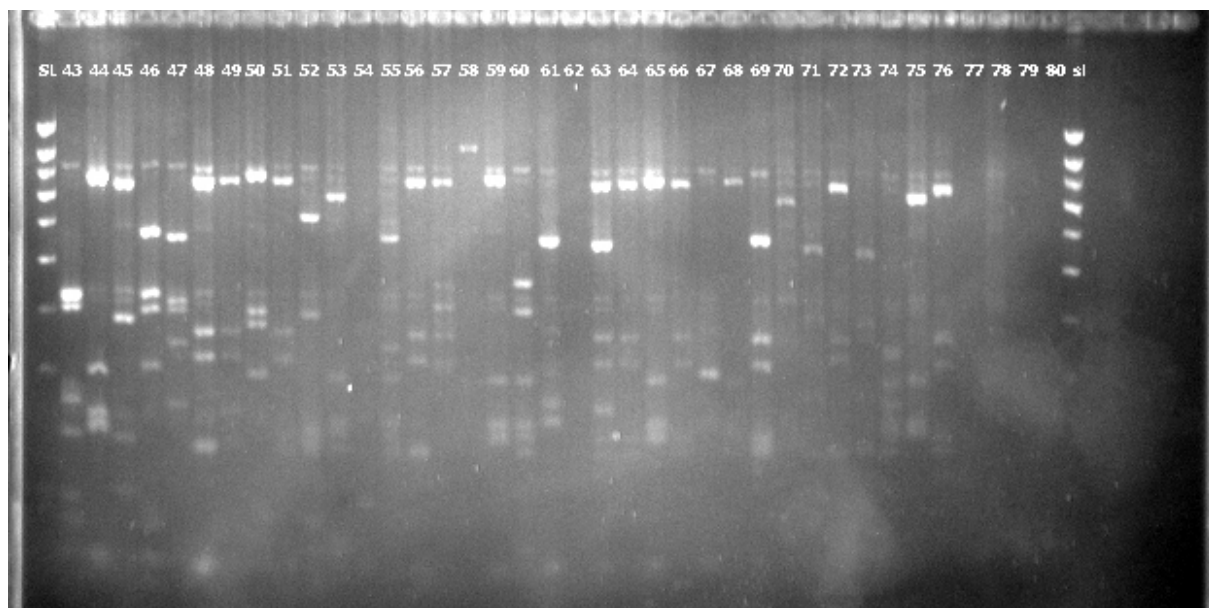
Gel Digestion AA4 HinfI, puits 1 à 42.



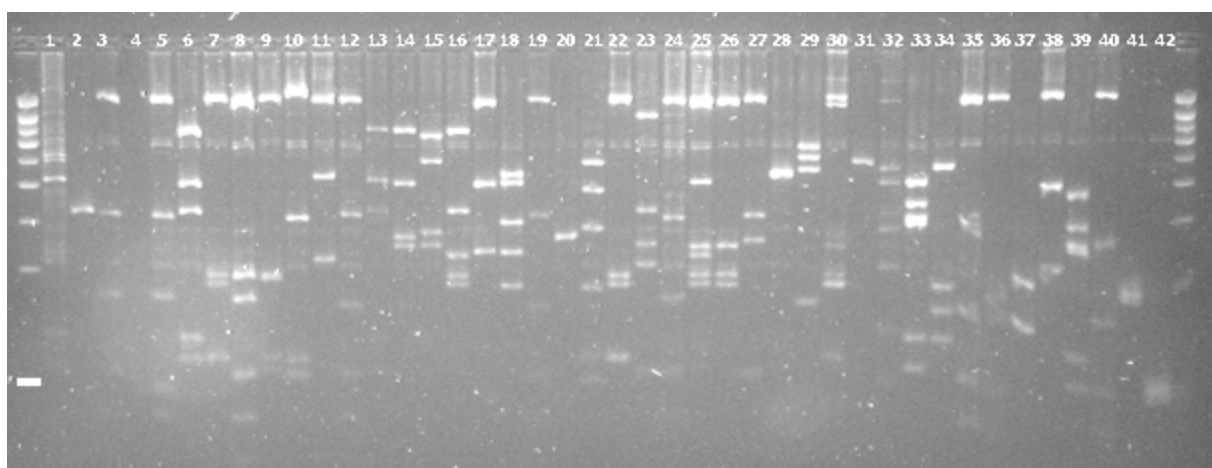
Gel Digestion AA4 HinfI, puits 43 à 80.



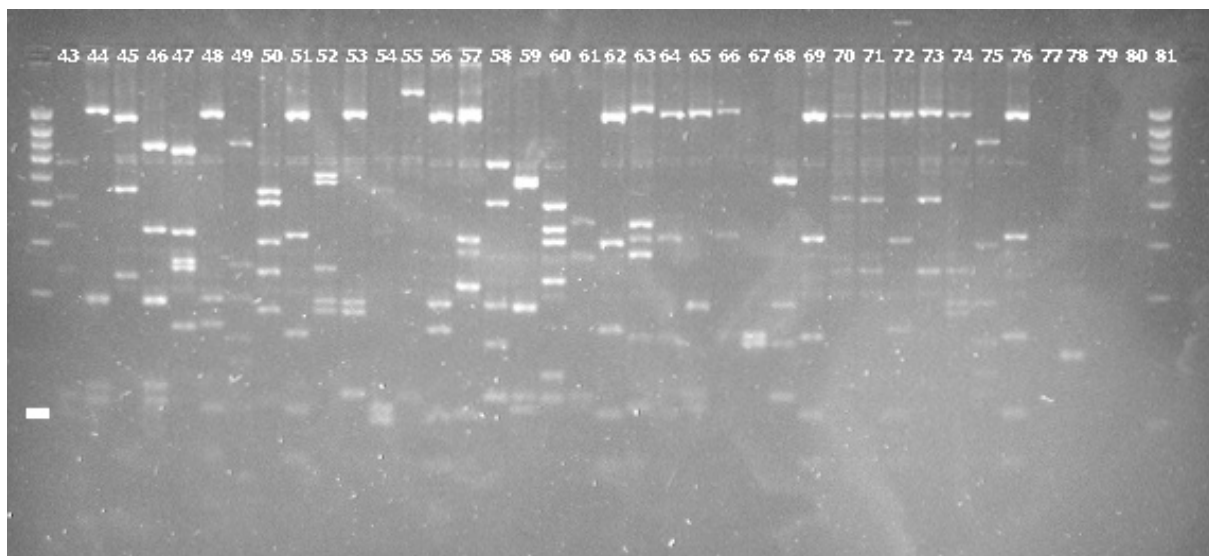
Gel Digestion Z4 HaeIII, puits 1 à 42.



Gel Digestion Z4 HaeIII, puits 43 à 80.



Gel Digestion Z4 HinfI, puits 1 à 42.



Gel Digestion Z4 HinfI, puits 43 à 80.

Annexe IV : Séquences

Z4-88 : 806 bp

GCAAGTCGACGAGAAGGGGCTTCGGTCTGAGTAGAGTGGCGCACGGGAGAGTAACGCGTAG
GTAATCTACCTCTGCATCTGGGATAACACTTCGAAAGGGGTGCTAATACCGGATACACTTATGTGT
CGCAAGACGTATAAGGAAAGGAGACGATCCGCAAGGAGTTTCTGTGTAGAGATGAGCCTGCGTCC
CATTAGCTAGTTGGCAGGGTAAAGGCCTACCAAGGCGACGATGGGTAGCGGGTCTGAGAGGATGA
TCCGCCACACTGGAACGAAACACGGACCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGAGGAATATTGGA
CAATGGGCGCAAGCCTGATCCAGCGACGCCGCGTGAGTGATGAAGGCCTTTGGGTCGTAAAGCTC
TGTCAGCAGGGAAGAACGGCCGTGTGGTTAATACCCATGCGGATTGACGGTACCTGCAGAGGAAG
CACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGTGCGAGCGTTAATCGGAATTACT
GGGCGTAAAGGGCGCGTAGGCGGCTGATCAAGTCAGGTGTGAAAGCCCACGGCTTAACCGTGTGA
AGTGCATCTGAACTGGTCGGCTTGAATATCGGAGAGGAAAGTGAATTTCCCGGTGTAGAGGTGA
AATTCGTAGATATCGGGAGGAATACCGGTGGCGAAGGCGACTTTCTGGACGAATACTGACGCTGA
GGCGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTTAGTCCACAGCTGTAAACGATGT
GCACTAGATGTGGGGAAGTGTGACCTT

Z4-40 : 615 bp

CCTTACCATGCAAGTCGAACGAGAAAGTTGGCTTCGGCCGATGAGTAAAGTGGCGCATTGGA
GAGTAACGCGTGGATAATCTACCCCTTAGTCGGGAATAACTCATCGAAAGGTGAATTAATACCGG
ATAACACTGCATGACTACTGTTGTGCAGTCAAAGAAGGCCTCTGCTTGCATGCTTTTGCTGAAGGA
TGAGTCCGCGTACCATTAGCTAGTTGGTGGGGTAATGGCCTACCAAGGTTATGATGGTTAGCTGGT
CTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGAACGAAACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTG
AGGAATATTGCGCAATGGGGGAAACCCTGACGCAGCAACGCCGCGTGAGTGAGGAAGGTTTTCGG
ATTGTAAAGCTCTGTGAGCGGAAAGAAGTGCATGGTGGCTAATATCCATCATGCTTGACGGTACC
GCTAAAGGAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGGGGGTGCAAGCGTTGT
TCGGAATTATTGGGCGTAAAGAGCGTGTAGGCGGCTTGACAAAGTCAGATGTGAAATCCCTGGGC
TTAACCCAGGAAGTGCATTTGAAACTGTCT

Z4-19 : 833 bp

CTACACATGCAAGTCGAGCGGTAGAGAGAAGCTTGCTTCTCTTGAGAGCGGCGGACGGGTGA
GTAATGCCTAGGAATCTGCCTGGTAGTGGGGGATAACGTTTCGAAACGGACGCTAATACCGCATA
CGTCCTACGGGAGAAAGCAGGGGACCTTCGGGCCCTTGCGCTATCAGATGAGCCTAGGTTCGGATTA
GCTAGTTGGTGAGGTAATGGCTCACCAAGGCGACGATCCGTAACCTGGTCTGAGAGGATGATCAGT
CACACTGGAACCTGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATG
GGCGAAAGCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGTCTTCGGATTGTAAAGCACTTTAA
GTTGGGAGGAAGGGCAGTTACCTAATACGTGATTGTTTTGACGTTACCGACAGAATAAGCACCGG
CTAACTCTGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACAGAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGT
AAAGCGCGCGTAGGTGGTTAGTTAAGCTGGATGTGAAATCCCCGGGCTCAACCTGGGAACTGCAT
TCAAAACTGACTGACTAGAGTATGGTAGAGGGTGGTGGAAATTCCTGTGTAGCGGTGAAATGCGT
AGATATAGGAAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACCCTGGACTGATACTGACACTGAGGTGCG
AAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGTCAACTAGC
CGTTGGGAGCCTTGAGCTCTTAGTGCGCAGCTAACGCATTAAGTTGACCGCCTGGG

Z4-65 : 795 bp

CATGCAGTCGGACGGAATGAGGGGCTTGCTCCTCATTTAGTGCGGCACGGGTGAGTAACGCG
TAGATAATCTGCCTGATGATCTGGAATAACACTTCGAAAGGGGTGCTAATACCGGATAAGCCCAC
GAGTGCCTTGGTGCTTGCGGGAAAAGGGGGGACCTTCGGGCCTTCTGTCATCAGATGAGTCTGCG
TACCATTAGCTAGTTGGTAGGGTAATGGCCTACCAAGGCTACGATGGTTAGCTGGTCTGAGAGGAT
GATCAGCCACACTGGAAGTGAAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATTTTG
CGCAATGGGCGAAAGCCTGACGCAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGCTTTCGGGTCGTAAAGC
TCCGTCGAGGGGAAAGAAGTGTATTGTGGCTAATATCCACGATACTTGACGGTACCCCTAAAGGA
AGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGGGGGTGCAAGCGTTGTTCCGATTTA
TTGGGCGTAAAGCGCGTGAGGCGGTTTGTAAAGTCTGATGTGAAAGCCCTGGGCTCAACCCAGG
AAGTGCATTGAAACTGGCAGACTTGAATACGGGAGAGGGTAGTGGAATTCCTGGTGTAGGAGTG
AAATCCGTAGATATCAGGAGGAACACCGGTGGCGAAGGCGGCTACCTGGACCGATATTGACGCTG
AGACGCGAAAGCGTGGGTAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAG
TACTAGGTGTTGCGGG

Z4-20 : 738 bp

TGCAAGTCGAACGGAAGTAAGAAGCTTGCTTTTTACTTTAGTGCGGCACGGGAGAGTAACGC
GTAGATAATCTGCCTTGGAACTCTGGGATAACATCTCGAAAGGGGTGCTAATACCTGATAAGCCCAC
GGAGGCGCGAGTCTTTGCGGGAAAAGGGGGCCTCTGAACATGCTCCTGTTTCAAGATGAGTCTGC
GTACCATTAGCTAGTTGGTGGGGTAAGGGCCTACCAAGGCTACGATGGTTAGCTGGTCTGAGAGG
ATGATCAGCCACACTGGAAGTGAAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATTT
TGCGCAATGGGGGCAACCCTGACGCAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGCTTTCGGGTCGTAAA
GCTCTGTCAAGAGAGACGAAGTGTAGGGAGGCTAATACCCTTTTACTTGACGGTACCTCTGAAGG
AAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGTGCAAGCGTTGTTCCGGAATT
ATTGGGCGTAAAGCGCGTGAGGCGGTTTGTAAAGTCTGATGTGAAAGCCCCGGGCTCAACCTGG
GAAGTGCATTGGAAGTGGCAGACTTGAATACGGGAGAGGGTAGTGGAATTCCTGGTGTAGGAGT
GAAATCCGTAGATATCAGGAGGAACACCGGTGGCGAAGGCGGCTGCCTGGACCGATATTGACGCT
GAGACGCGAAAGCGTGGGGAGCAA

Z4-58 : 668 bp

CATGCAGTCGAGCGGTAGAGAGAAGCTTGCTTCTCTTGAGAGCGGCGGACGGGAGAGTAATG
CCTAGGAATCTGCCTGGTAGTGGGGGATAACGTTTCGGAAACGGACGCTAATACCGCATACGTCCT
ACGGGAGAAAGCAGGGGACCTTCGGGCCTTGCGCTATCAGATGAGCCTAGGTCCGATTAGCTAGT
TGGTGAGGTAATGGCTACCAAGGCGACGATCCGTAAGTGGTCTGAGAGGATGATCAGTCACACT
GGAAGTGAAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGA
AAGCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGTTGAAGAAGGTCTTCGGATTGTAAAGCACTTTAAGTTGGG
AGGAATTGGCAGTTACCTAATACGTGATTGTTTTGACGTTACCGACAGAATAAGCACCGGCTAACTC
TGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACAGAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGC
GCGTAGGTGGTTAGTTAAGTTGGATGTGAAATCCCCGGGCTCAACCTGGGAAGTGCATTCAAACT
GACTGACTAGAGTATGGTAGAGGGTGGTGGAAATTCCTGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATAG
GAAGGAACACCAGTGGCGA

Z4-59 : 626 bp

ATTTGCACCTAGTGGCGCACGGGTGAGTAATACGTGGGTAACCTACCTATTAGTCGGGGACAA
CAGTTGGAAACGACTGCTAATACCGGATAAAATGTGAAATGGTATCTTTTCATATTAAGGAGCT
TTCAAGCTTCGCTTTTAGATGGGCCTGCGGCGTATTAGTTAGTTGGTGAGGTAACGGCCCACCAAG
GCGACGATGGGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGAAGTGAAGACACGGTCCGGACT
CCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGGCAATGGGCGCAAGCCTGACCCAGCAACGCCGCGT
GAGGGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAACCTCTGTCTTAGGGACGAAAAAATGACGGTACCTAA
GGAGGAAGCTCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGAGCAAGCGTTGTCCG
GAATTACTGGGCGTAAAGGGTGCCTAGGTGGCCATGCAAGTCAGATGTGAAATCCCCGGGCTTAA
CTCGGGTGCTGCATTTGAAACTGCGTGGCTTGAGTGCAGGAGAGGAAAGCGGAATTCCTAGTGTA
GCGGTGAAATGCGTAGATATTAGGAGGAACACCAGTGGCGA

Z4-74 : 762 bp

CTAAACATGCAAGTCGAGCGGTAGAGAGAAGCTTGCTTCTCTTGAGAGCGGCGGACGGGTGA
GTAATGCCTAGGAATCTGCCTGGTAGTGGGGGATAACGTCCGAAACGGACGCTAATACCGCATA
CGTCCTACGGGAGAAAGCAGGGGACCTTCGGGCCTTGCGCTATCAGATGAGCCTAGGTCCGATTA
GCTAGTTGGTGAGGTAATGGCTCACCAAGGCGACGATCCGTAAGTGGTCTGAGAGGATGATCAGT
CACACTGGAAGTGAACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATG
GGCGAAAGCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGTCTTCGGATTGTAAAGCACTTTAA
GTTGGGAGGAAGGGTTGTAGATTAATACTCTGCAATTTTGACGTTACCGACAGAATAAGCACCGG
CTAACTCTGTGCCAGCAGCCGCGTAATACAGAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGT
AAAGCGCGCGTAGGTGGTTTGTAAAGTTGGATGTGAAAGCCCCGGGCTCAACCTGGGAAGTGCAT
TCAAAACTGACAAGCTAGAGTATGGTAGAGGGTGGTGGAAATTCCTGTGTAGCGGTGAAATGCGT
AGATATAGGAAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACCACCTGGACTGATACTGACACTGAGGTGCG
AAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAA

AA4-74 : 722 bp

CCTACACATGCAAGTCGAGCGGATGAAGGGAGCTTGCTCTCTGATTACGCGGCGGACGGGAG
AGTAATGCCTAGGAATCTGCCTGGTAGTGGGGGACAACGTTCCGAAAGGAGCGCTAATACCGCAT
ACGTCTACGGGAGAAAGTGGGGGATCTTCGGACCTCACGCTATCAGATGAGCCTAGGTCCGATT
AGCTAGTAGGTGGGGTAATGGCTACCTAGGCGACGATCCGTAAGTGGTCTGAGAGGATGATCAG
TCACACTGGAAGTGAACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAAT
GGGCGAAAGCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGTCTTCGGATTGTAAAGCACTTTA
AGTTGGGAGGAAGGGCAGTAAGTTAATACCTTGCTGTTTTGACGTTACCAACAGAATAAGCACCG
GCTAACTTCGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGAAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAGTTACTGGGCG
TAAAGCGCGCTAGGTGGTTTGGTAAGATGGATGTGAAATCCCCGGGCTCAACCTGGGAAGTGCAT
TCCATAACTGCCTGACTAGAGTACGGTAGAGGGTGGTGGAAATTCCTGTGTAGCGGTGAAATGCGT
AGATATAGGAAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACCACCTGGACTGATACTGACACTGAGGTGCG
AAAGCGTGGG

AA4-52 : 760 bp

CATGCAAGTCGAACGGTAGCACAGAGAGCTTGCTCTCGGGTGACGAGTGGCGGACGGGTGAG
TAATGTCTGGGAAACTGCCTGATGGAGGGGGATAACTACTGGAAACGGTAGCTAATACCGCATAA
CGTCGCAAGACCAAAGAGGGGGACCTTCGGGCCTCTTGCCATCAGATGTGCCAGATGGGATTAG
CTAGTAGGTGGGGTAATGGCTCACCTAGGCGACGATCCCTAGCTGGTCTGAGAGGATGACCAGCC
ACACTGGAAGTGAACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGG
GCGCAAGCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTATGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGTACTTTCAGC
GGGAGGAAGGTGTTGTGGTTAATAACCGCAGCAATTGACGTTACCCGCAGAAGAAGCACCGGCT
AACTCCGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAA
AGCGCACGCAGGCGGTCTGTCAAGTCGGATGTGAAATCCCCGGGCTCAACCTGGGAAGTGCATT
GAAACTGGCAGGCTAGAGTCTTGTAGAGGGGGGTAGAATTCCAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAG
AGATCTGGAGGAATACCGGTGGCGAAGGCGGCCCTGGACAAAGACTGACGCTCAGGTGCGAA
AGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAA

AA4-67 : 712 bp

CATGCAAGTCGAACGGTAGCACAGAGAGCTTGCTCTCGGGTGACGAGTGGCGGACGGGTGAG
TAATGTCTGGGAAACTGCCTGATGGAGGGGGATAACTACTGGAAACGGTAGCTAATACCGCATAA
CGTCGCAAGACCAAAGAGGGGGACCTTCGGGCCTCTTGCCATCAGATGTGCCAGATGGGATTAG
CTAGTAGGTGGGGTAACGGCTCACCTAGGCGACGATCCCTAGCTGGTCTGAGAGGATGACCAGCC
ACACTGGAAGTGAACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGG
GCGCAAGCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTATGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGTACTTTCAGC
GGGAGGAAGGTGTTGCGGTTAATAACCGCAGCAATTGACGTTACCCGCAGAAGAAGCACCGGCT
AACTCCGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAA
AGCGCACGCAGGCGGTCTGTCAAGTCGGATGTGAAATCCCCGGGCTCAACCTGGGAAGTGCATT
GAAACTGGCAGGCTAGAGTCTTGTAGAGGGGGGTAGAATTCCAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAG
AGATCTGGAGGAATACCGGTGGCGAAGGCGGCCCTGGACAAAGACTGACGCTCAGGTGCGAA

AA4-44 : 760 bp

CATGCAAGTCGAACGGTAGCACAGAGAGCTTGCTCTCGGGTGACGAGTGGCGGACGGGTGAG
TAATGTCTGGGAAACTGCCTGATGGAGGGGGGATAACTACTGGAAACGGTAGCTAATACCGCGTAA
CGTCGCAAGACCAAAGAGGGGGGACCTTCGGGCCTCTTGCCATCAGATGTGCCCAGATGGGATTAG
CTAGTAGGTGGGGTAATGGCTCACCTAGGCGACGATCCCTAGCTGGTCTGAGAGGATGACCAGCC
ACACTGGAAGTGAAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGG
GCGCAAGCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTATGAAGAAGGCCTTCGGGTGTAAAGTACTTTTCAGC
GGGGAGGAAGGTGTTGTGGTTAATAACCGCAGCAATTGACGTTACCCGCAGAAGAAGCACCGGCT
AACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAA
AGCGCACGCGGGCGGTCTGTCAAGTCGGATGTGAGATCCCCGGGCTCAACCTGGGAAGTGCATT
GAAACTGGCAGGCTAGAGTCTTGTAGAGGGGGGTAGAATTCCAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAG
AGATCTGGAGGAATACCGGTGGCGAAGGCGGCCCCCTGGACAAAGACTGACGCTCAGGTGCGAA
AGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAA

AA4-23 : 681 bp

CATGCAGTCGACGGTAGCACAGAGAGCTTGCTCTCGGGTGACGAGTGGCGGACGGGTGAGTA
ATGTCTGGGAAACTGCCTGATGGAGGGGGGATAACTACTGGAAACGGTAGCTAATACCGCATAACG
TCGCAAGACCAAAGAGGGGGGACCTTCGGGCCTCTTGCCATCAGATGTGCCCAGATGGGATTAGCT
AGTAGGTTGGGTAACGGCTCACCTAGGCGACGATCCCTAGCTGGTCTGAGAGGATGACCAGCCAC
ACTGGAAGTGAAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGG
GCAAGCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTATGAAGAAGGCCTACGGGTGTAAAGTACTTTTCAGCG
GGGAGGAAGGTGTTGTGGTTAATAACCGCAGCAATTGACGTTACCCGCAGAAGAAGCACCGGCTA
ACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAA
GCGCACGCAGGCGGTCTGTCAAGTCGGATGTGAAATCCCCGGGCTCAACCTGGGAAGTGCATT
AACTGGCAGGCTAGAGTCTTGTAGAGGGGGGTAGAATTCCAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGA
GATCTGGAGGAATACCGGTGGCGAAGGCGGCCCC

AA4-8 : 720 bp

CATGCAAGTCGAACGGTAGCACAGAGAGCTTGCTCTCGGGTGACGAGTGGCGGACGGGTGAG
TAATGTCTGGGAAACTGCCTGATGGAGGGGGGATAACTACTGGAAACGGTAGCTAATACCGCATAA
CGTCGCAAGACCAAAGAGGGGGGACCTTCGGGCCTCTTGCCATCAGATGTGCCCAGATGGGATTAG
CTAGTAGGTGGGGTAACGGCTCACCTAGGCGACGATCCCTAGCTGGTCTGAGAGGATGACCAGCC
ACACTGGAAGTGAAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGG
GCGCAAGCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTATGAAGAAGGCCTTCGGGTGTAAAGTACTTTTCAGC
GGGGAGGAAGGTGTTGTGGTTAATAACCGCAGCAATTGACGTTACCCGCAGAAGAAGCACCGGCT
AACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAA
AGCGCACGCAGGCGGTCTGTCAAGTCGGATGTGAAATCCCCGGGCTCAACCTGGGAAGTGCATT
GAAACTGGCAGGCTAGAGTCTTGTAGAGGGGGGTAGAATTCCAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAG
AGATCTGGAGGAATACCGGTGGCGAAGGCGGCCCCCTGGACAAAGACTGACGCTCAGGTGCGAA
AGCGTGGG

AA4-32 : 716 bp

CATGCAAGTCGAGCGGATGAAGGGAGCTTGCTCTCTGATTACGCGGCGGACGGGTGAGTAAT
GCCTAGGAATCTGCCTGGTAGTGGGGGACAACGTTCCGAAAGGAGCGCTAATACCGCATAACGTCC
TACGGGAGAAAGTGGGGGATCTTCGGACCTCACGCTATCAGATGAGCCTAGGTTCGGATTAGCTAG
TAGGTGGGGTAATGGCTACCTAGGCGACGATCCGTAACCTGGTCTGAGAGGATGATCAGTCACAC
TGGAAGTGAAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGA
AAGCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGTCTTCGGATTGTAAAGCACTTTAAGTTGGG
AGGAAGGGCAGTAAGTTAATACCTTGCTGTTTTGACGTTACCAACAGAATAAGCACCGGCTAACTT
CGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGAAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGC
GCGTAGGTGGTTTGGTAAGATGGATGTGAAATCCCCGGGCTCAACCTGGGAAGTGCATCCATAACT
GCCTGACTAGAGTACGGTAGAGGGTGGTGGAAATTCCTGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATAG
GAAGGAACACCACTGGCGAAGGCGACCACTGGACTGATACTGACACTGAGGTGCGAAAGCGTG
GG

AA4-35 : 759 bp

CATGCAGTCGAACGGTAGCACAGAGAGCTTGCTCTCGGGTGACGAGTGGCGGACGGGTGAGT
AATGTCTGGGAAACTGCCTGATGGAGGGGGATAACTACTGGAAACGGTAGCTAATACCGCATAAC
GTCGCAAGACCAAAGAGGGGGACCTTCGGGCCTCTTGCCATCGGATGTGCCCAGATGGGATTAGC
TAGTAGGTGGGGTAATGGCTCACCTAGGCGACGATCCCTAGCTGGTCTGAGAGGATGACCAGCCA
CACTGGAACTGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGG
CGCAAGCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTATGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGTACTTTCAGCG
GGGAGGAAGGTGTTGTGGTTAATAACCGCAGCAATTGACGTTACCCGCAGAAGAAGCACCGGCTA
ACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAA
GCGCACGCAGGCGGTCTGTCAAGTCGGATGTGAAATCCCCGGGCTCAACCTGGGAACTGCATTCTG
AACTGGCAGGCTAGAGTCTTGTAGAGGGGGGTAGAATTCCAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGA
GATCTGGAGGAATACCGGTGGCGAAGGCGGCCCCCTGGACAAAGACTGACGCTCAGGTGCGAAA
GCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAA

Annexe V : Communication écrite

c7008

Chemical and Microbial Characterisation of Industrial Sediment Contaminated With both Explosives and Herbicides

Geoffrey Perchet, Laboratory Agronomy Environment Ecotoxicology, ENSAT, perchet@ensat.fr

Matthieu Sangely, Laboratory Agronomy Environment Ecotoxicology, ENSAT

George MERLINA, Laboratory Agronomy Environment Ecotoxicology, ENSAT

Marisol Goñi, Laboratoire d'Ecologie Moléculaire, Université de Pau et des Pays de l'Adour, PAU, France.

Jean-Claude Revel, Laboratory Agronomy Environment Ecotoxicology, ENSAT

Eric Pinelli, Laboratory Agronomy Environment Ecotoxicology, ENSAT

INTRODUCTION

Nitration reactions of aromatic compounds are commonly involved in military industrial processes. A wide range of nitro-aromatic and nitramines molecules has been produced for pyrotechnic applications (*e.g.* hexahydro-1,3,5-trinitro-1,3,5-triazine or RDX, octahydro-1,3,5,7-tetranitro-1,3,5,7-tetrazocine or HMX, and trinitrotoluene or TNT, and picric acid) as well as for herbicide synthesis (*e.g.* 2-*tert*-butyl-4,6-dinitrophenol or Dinoterb, and 2-*sec*-butyl-4,6-dinitrophenol or Dinoseb). Military industries have been treating their process effluents using laguna systems for many years. Sediments from these lagunas are stained by complex mixtures of different xenobiotics. Considering the remanence of nitro-aromatic and nitramine compounds, these sediments are today sources of contaminations for soils, groundwater and surface water. In this work, a sediment extracted from a laguna has been studied. This paper describes a site characterization by showing physico-chemical properties of sediment and organic content. In addition, microorganisms diversity of this sediment is revealed by using 16S rRNA gene sequence analysis.

MATERIALS AND METHODS

Physico-chemical analysis of sediment

Sediment was collected from a site that produced different nitro-aromatic and nitramine compounds. Sample origin used in this experiment was in the most contaminated location of the laguna. This sample was named Z4. All the samples collected were stored at 4°C before analysed. In order to know physicochemical properties of our material, solution was made by mixing 15g of sediment with 1L of distilled water. The pH of the sediment was measured with a Denver Ultrabasic pH meter Station. Major cations (Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+}) and anions (Cl^- , NO_2^- , NO_3^- , HPO_4^{2-} , SO_4^{2-}) in the sludge were measured using a Dionex DX-100 Ion Chromatograph. Organic elemental analysis (C, H, O, N, S) was determined by dry combustion in Micro analyzer CHN Fisons Instruments, UK. The concentrations of Dinoseb, Dinoterb, RDX and HMX were determined using a high performance liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS) system. (Surveyor Pump, Thermo; Surveyor Autosampler, Thermo, USA).

Bacterial communities study

Bacterial DNA was extracted from samples using the ULTRACLEAN™ Soil DNA extraction Kit (Mo Bio Laboratories inc., Carlsbad, CA). A 16S rRNA gene clone library was realized. The purified PCR amplicons were ligated into the Topo vector supplied with the TOPO TA Cloning kit (Invitrogen, Carlsbad, CA) as described by the manufacturer. RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) analysis and sequencing of 16S rRNA gene clones was then realized 80 purified clones PCR products of each sample were selected and digested with *Hae*III and *Hinf* I (New England Biolabs). Sequences were compared with Genbank database existing 16S rRNA gene sequences, using BLASTN.

RESULTS

Physico-chemical analysis of sediments coming from an old industrial laguna revealed that these sediments can be assimilated to an industrial sludge. The pH of this sludge in this area was 6.55 and except for Ca^{2+} (3.5mM), a poor mineral content was generally measured. Elemental analysis (C, H, O, N, S) revealed a high content in carbon (25.4%), oxygen (18.7%) and nitrogen (8.4%). A significant presence of sulphur was detected (0.6%). Concentrations of Dinoseb, Dinoterb, HMX and RDX in Z4 sludge were respectively: 16g/kg, 48g/kg, 0.08g/kg, 5.5g/kg. All these data showed a high organic content dealing with extreme conditions. Few studies have been realized on such material, mixing both herbicides and explosives compounds in high concentrations. The nature and the diversity of these compounds illustrate the complexity and the originality of the material studied Microbial

DNA was extracted from sludge and sixty four clones were analysed by RFLP, showing 47 different profiles. 16S rRNA sequencing revealed the presence of three major families of bacteria: *Pseudomonaceae*, *Geobacteriaceae*, and *Clostridiaceae*. Three clones belong to *Pseudomonaceae* family were detected. Two clones have 99% homology with *Pseudomonas veronii* and one clone matches at 99% with *Pseudomonas gessardi* and *Pseudomonas putida*. One clone is related to the *Clostridiaceae* family and has less than 98% homology with the closest organism which is uncultured. The concomitant presences of *Clostridiaceae* (strict anaerobes), and *Pseudomonaceae* which has an aerobic metabolism, indicate variation in oxygenation condition in the sediment. The surface of the laguna undergoes seasonal variation. This zone is dry from April to September and wet during the other period. *Geobacteriaceae* are anaerobes commonly found in environment especially in saturated zone as aquifers. Some representatives of this family can couple organic matter oxidation with iron oxides reduction. This property can be used in uranium bioremediation assay, using organic matter oxidation to reduce uranium and change its sorption properties. It can also be used for organic contamination bioremediation, introducing iron oxides to oxidize the organic pollutants. In addition, several strands of *Pseudomonaceae* as *P. Putida* or *P. veronii* has been largely described for their biodegradation properties to nitroaromatic compounds. In the same way, *Clostridiaceae* (*Clostridium sp EDB2*) are also known to degrade explosives.

CONCLUSION

Studies of diversity of bacterial communities associated to such pollutants are scarce. To our knowledge only one rapport analyse bacterial diversity associated with Dinoterb, showing a bacterial diversity completely different to that found in our work.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work is supported by a grant n° 03-79-144 of the Direction Générale de l'Armement (DGA, FRANCE). We wish to thanks Mr Pechoux and Mr Mericam-Bourdet from DGA agency. We would like to thank Mr Spyckerelle (EURENCO FRANCE) for his help and advices in security.

Annexe VI : Ajustement du pH des prélèvements avant extraction et dosage

Afin de confirmer le comportement du Dinoterb (DNTB) apparemment dépendant du pH, une expérience a été réalisée en amenant une solution de Dinoterb standard de concentration 10mg/L dans de l'eau (conditions non saturantes) à différents pH.

Nous pouvons observer sur la figure 1 que le pH a une influence directe sur la solubilité du DNTB, ceci a une importance fondamentale, la fermentation réalisée au sein des fermenteurs abaissant le pH en présence de Glucose. En effet nous pouvons observer que le DNTB est moins soluble à pH 5 qu'à pH 7.5.

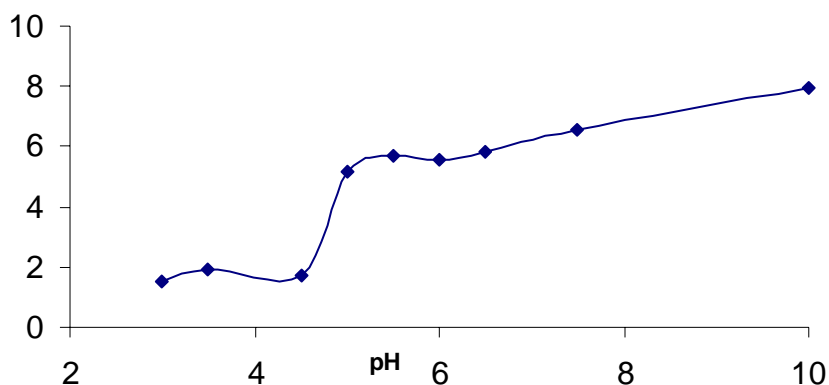


Figure 72 : Modification de la solubilité du DNTB en fonction du pH

Ces résultats confirment l'importance du rôle du pH dans la solubilité du Dinoterb et la modification de sa disponibilité au cours de la fermentation. En effet, au cours des fermentations, l'abaissement du pH a pour conséquence une diminution naturelle de la concentration en Dinoterb qu'il ne faut pas confondre avec une dégradation. Ainsi, cette expérience justifie l'ajustement du pH de chaque prélèvement à 7.5 avant extraction. Il est à noter que la solubilité des autres composés à savoir le Dinoseb, l'hexogène et l'octogène sera également maîtrisée par un pH fixe.

Annexe VII : Article

Study of bacterial communities in sediment of an old industrial laguna and in a successful bioremediation assay on nitrated compounds

Geoffrey Perchet ¹, Matthieu Sangely¹, Marisol Goñi², Georges Merlina¹, Jean-Claude Revel¹, Eric Pinelli¹.

¹Laboratoire Agronomie Environnement Ecotoxicologie. Ecole Nationale Supérieure Agronomique de TOULOUSE, France,

²Laboratoire d'Ecologie Moléculaire. Université de Pau et des Pays de l'Adour, PAU, France.

Abstract

Nitration reactions of aromatic compounds are commonly involved in military industrial processes. A wide range of nitro-aromatic and nitramine molecules has been produced for pyrotechnic applications. Military industries have been treating their process effluents using laguna systems for many years. In view of bioremediation assay, the sediment of a laguna was investigated. In a first step, a physico-chemical characterization of the sediments was realized. The results revealed the organic nature of the sediment (25.4% of Carbon with a C: N = 3) and the presence of high concentrations of RDX (hexahydro-1,3,5-trinitro-1,3,5-triazine), HMX (octahydro-1,3,5,7-tetranitro-1,3,5,7-tetrazocine) as well as herbicides Dinoterb (2-*tert*-butyl-4,6-dinitrophenol) and Dinoseb (2-*sec*-butyl-4,6-dinitrophenol). The 16S rRNA gene sequence analysis revealed the presence of three dominant families, *Geobacteriaceae*, *Clostridiaceae* and *Pseudomonaceae* and the presence of three potential new germs. The bioremediation assay was conducted in anaerobic condition in Winogradsky medium complemented with glucose. In these conditions 100% of Dinoterb and Dinoseb were degraded after 75 days of culture. In these conditions, RDX and HMX were not consumed. The 16S rRNA gene sequence analysis of the culture media showed a drastic restriction in the biodiversity and the presence of *Leclercia adecarboxylata*, two members of the *Enterobacteriaceae* family and a member of *Pseudomonaceae* family.

INTRODUCTION

Nitration reactions of aromatic compounds are commonly involved in military industrial processes. A wide range of nitro-aromatic and nitramine molecules has been produced for pyrotechnic applications (*e.g.* RDX, HMX, TNT, and picric acid) as well as for herbicide synthesis (*e.g.* Dinoterb, Dinoseb). Military industries have been treating their process effluents using laguna systems for many years. Sediments from these lagunas are stained by complex mixtures of different xenobiotics. Considering the remanence of nitro-aromatic and nitramine compounds, these sediments are today sources of contaminations for soils, groundwater and surface water, (2, 25, 35). In addition, most of them are dramatically toxic. RDX and its metabolites are currently reported to damage soil and water organism (24, 29, 38). Robidoux et al. (30) have described significant effects of HMX on growth and reproduction of the earthworm (*Eisenia Andrei*). The Dinoseb 96h LC50 value for Chinook salmon alevins has been determined to be 70,6 ppb and a 87% mortality for Chinook Salmon alevins has been observed after an 96h-exposure to 100 ppb (36). Dinoterb is reported to be hepatotoxic between 10 and 100 $\mu\text{mol/liter}$ after 2 h of incubation and turn much more toxic when undergoing a 24hr exposure to rat hepatocytes. Dinoterb has been retired from sells in April 1998 by European Authority (98/269/CE decision) and nitrophenols are rated as priority pollutant (HR-3 grade) by US Environment Agency.

Several bacteria and fungi are reported to degrade nitroaromatic compounds like TNT (32) or nitramines. *Rhodococcus sp.* Strain DN22 (8), *Stenotrophomonas maltophilia* (6) and the fungus *Phanerochaete chrysosporium* (11) aerobically degrade RDX. *Klebsiella pneumoniae* (39), and others members of *Enterobacteriaceae* family (17) metabolize it in facultative anaerobic conditions. In addition, some strict anaerobes members of *Clostridiaceae* family are able to transform RDX (27, 40). Zhao et al. have also isolated some psychrophilic RDX- and HMX-degrading bacteria from a contaminated marine sediment (4,41, 42).

Like explosives compounds, dinitrophenol compounds are made of nitrated groupment. Dinoseb can be completely degraded undergoing anaerobic microbial consortium action (15). *Clostridium bifermentans* KMR-1 has been showed to have Dinoseb degradation properties with the help of fermentable carbohydrates. (0) A very little is known about dinoterb biodegradation.

Our contaminated materiel, a sludge extracted from a laguna which has received for barely several decades military manufacture's effluents, contains at least 4 nitrified cyclic compounds (RDX, HMX, Dinoseb and Dinoterb) (FIG. 1). This paper describes the chemical profile and the bacterial ecology of this sediment. A successful assay of bioremediation for two compounds, Dinoseb and Dinoterb is reported in this study. In addition, microorganisms potentially involved in this process are identified.

MATERIALS AND METHODS

Chemicals. The explosives RDX and HMX standards were obtained from Restek (Paris, France). The herbicides Dinoseb and Dinoterb standards were purchased from Cluzeau (Paris, France). Methanol, Acetonitrile and HPLC grade water were obtained from Fischer (Illkirch, France).

Sediment sample and physico-chemical analysis. Sediment was collected from a site that produced Dinoseb, Dinoterb, RDX and HMX for several decades. Production wastewater was stored in a laguna where sediment samples were taken. Sample (Z4) used in this experiment was in the most contaminated location. All the samples were stored at 4°C. Organic elemental analysis (C, H, O, N, S) was determined by dry combustion in Micro analyzer CHN Fisons Instruments, UK. In order to know physicochemical properties of our material, solution was made by mixing 15g of sludge with 1L of distilled water. The pH of the sludge was measured with a Denver Ultrabasic pH meter Station. Major cations (Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+}) and anions (Cl^- , NO_2^- , NO_3^- , HPO_4^{2-} , SO_4^{2-}) in the sludge were measured using a Dionex DX-100 Ion Chromatograph. Initial concentrations of Dinoseb, Dinoterb, HMX and RDX in Z4 sediment were respectively: 16g/kg, 48g/kg, 0,08g/kg, 5,5g/kg.

Bioremediation assay. Assays were realized in 1.5L reactors sealed in anaerobic conditions under nitrogen flow at 35°C under stirring. 15g of sediment were suspended in 1L of Winogradsky culture medium containing K_2HPO_4 5g/l, MgSO_4 2.5g/l, NaCl 2.5g/l, FeSO_4 0.05g/L, MnSO_4 0.05g/l., with glucose 5g/L (AA4) or without Glucose (Control). Each assay was realized in triplicate. Dinoseb, Dinoterb, HMX and RDX present in the sediment served as the sole N source. Initial concentrations of Dinoseb, Dinoterb, HMX and RDX in reactors were respectively: 1.34mg/L, 2.87mg/L, 1.4 mg/l and 25 mg/L. For each bioremediation assay, samples were taken every 15 days.

Extraction and analysis of explosives and herbicides. pH of each sample measured and adjusted to 7.5, in order not to disturb organic compounds solubility and spectrophotometric properties. Enrichments were then filtered through 3 μ filters from Fischer (France). Explosives and herbicides compounds were extracted with RDX Porapak cartridges from Waters (Massachusetts, USA). Because of the high concentrations of organic compounds, only 5mL of sample were added to the cartridge. Explosives and herbicides were eluted with 5mL of acetonitrile.

The concentrations of Dinoseb and Dinoterb were determined using a high performance liquid chromatography-mass spectrometry (CLHP-MS) system. (Surveyor Pump, Thermo ; Surveyor Autosampler, Thermo, USA) 10 μ L extract was injected into the HPLC system equipped with a reversed-phase column (Hypersil ODS C18, 3 μ , 4.6mm Φ x 150mm, Thermo). The solvents systems used were solvent A (Methanol) and solvent B (HPLC grade water). Compounds were eluted at a flow rate of 0.8mL/min by using a gradient starting with 26% of solvent A, followed by a gradual increase to 74% solvent A in 18mn.

Mass spectrometry was performed with an ion trap spectrometer. (LCQ Advantage Max, Thermo). The following settings were used: capillary temperature: 280°C, Sheath gas: 40, Auxiliary gas: 10. Source voltage: 4.5kV.

The concentrations of RDX and HMX were determined using a high performance liquid chromatography-UV detector (CLHP-UV) using a PDA detector from Thermo. Absorbance of

explosives compounds was read at 235nm.

DNA extraction and 16S gene amplification. Bacterial DNA was extracted from samples using the ULTRACLEANTM Soil DNA extraction Kit (Mo Bio Laboratories inc., Carlsbad, CA). The weights of sample Z4 and AA4 were determined to be respectively 0.81g and 1.14 g. A control electrophoresis was performed on a 1% agarose-TAE gel.

16S rDNA egene were amplified by PCR from extracted DNAs PCR mixture consisted of 5 µL of PCR buffer, 2.5 µL of MgCl₂ (50 mM), 0.5 µL of dNTP (20mM), 0.5 µL of each primers (8f 20mM (Lane, 1991) and 1489R 20mM (Weisburg et al 1991)), 5 µL of DNA extraction product and 0.5µL of Taq polymerase (Eurobio). MilliQ water was added till of final volume of 50µL. Reactions were cycled in a PTC200 thermocycler (MJ Research, USA). The conditions were an initial denaturation step at 94°C for 5 min, followed by 35 cycles of 94°C for 45 s, 52°C for 45 s and 72°C for 1 min. A final step of 72°C for 10 min corresponded to the final elongation step. A control electrophoresis was performed on a 1% agarose-TAE gel.

PCR products were purified using the GFXTM PCR DNA and Gel Band Purification Kit (Amersham Biosciences, Uppsala, Sweden). The purification products were also verified by electrophoresis on a 1% agarose-TAE gel.

16S rRNA gene clone library. The purified PCR amplicons were ligated into the Topo vector supplied with the TOPO TA Cloning kit (Invitrogen, Carlsbad, CA) as described by the manufacturer. The ligation mixture was transformed into TOPO 10F' competent cells supplied by the same TOPO TA cloning kit. Recombinant vectors were selected on LB agar plates (NaCl, 10g/L; tryptone, 10g/L, yeast extract, 5g/L; pH 7.5) containing X-Gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-beta-D-galactopyranoside) and ampicillin (50 µg/mL) for overnight incubation at 37°C. 94 recombinant clones were reamplified by PCR. The PCR mixture consisted of 2.5 µL of PCR buffer, 0.75 µL of MgCl₂ (50 mM), 0.5 µL of dNTP (20mM), 0.5 µL of each primers (M13 F, 20mM and M13 R, 20mM) and 0.5µL of Taq polymerase (Eurobio). Milli Q water was added till of final volume of 25µL. The PCR temperature cycle was performed using a PTC 200 apparatus (MJ Research, USA). The conditions were an initial denaturation step at 94°C for 5 min, followed by 35 cycles of 94°C for 45 s, 52°C for 45 s and 72°C for 1 min. A final step of 72°C for 10 min corresponded to the final elongation step. PCR products were randomly verified by electrophoresis on a 1% agarose-TAE gel. PCR products were purified using the GFXTM PCR DNA and Gel Band Purification Kit (Amersham Biosciences, Uppsala, Sweden). The purification products were also verified by electrophoresis on a 1% agarose-TAE gel.

RFLP analysis and sequencing of 16S rRNA gene clones. 80 purified clones PCR products of each samples were selected and digested with *Hae*III and *Hinf* I (New England Biolabs). The digestion mixture consisted of 1µL of buffer n°2, 5U of enzyme, 2 µL of purified clone PCR clone product. MilliQ water was added till of final volume of 10µL. The digests were eletrophoresed (4h, 25V) on a 88 wells 3% agarose TBE gel stained with ethidium bromide. Restriction profile with at least 2 representant were selected for sequencing in Z4 sample. All different profiles were sequenced in AA4 sample.

The selected clones were named after the sample name followed with the clone ID number. Selected clones have undergone a sequencing reaction using Big Dye Terminator v 3.1 cycle sequencing kit (Applied Biosystem) Senquencing was performed at *plateforme genomique fonctionnelle* of university of Bordeaux I. The length of sequences were ranging from 615 bp and 833 bp.

Phylogenetic analysis of 16S rRNA gene sequences. Sequences were compared with Genbank database existing 16S rRNA gene sequences, using BLASTN: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/Blast.cgi?CMD=Web&LAYOUT=T=TwoWindows&AUTO_FORMAT=Semiauto&ALIGNMENTS=50&ALIGNMENT_VIEW=Pairwise&CLIENT=web&DATABASE=nr&DESCRIPTIONS=100&ENTREZ_QUERY=%28none%29&EXPECT=10&FILTER=L&FORMAT_OBJECT=Alignment&FORMAT_TYPE=HTML&NCBI_GI=on&PAGE=Nucleotides&PROGRAM=blastn&SERVICE=plain&SET_DEFAULTS.x=34&SET_DEFAULTS.y=8&SHOW_OVERVIEW=on&END_OF_HTTPGET=Yes&SHOW_LINKOUT=yes&GET_SEQUENCE=yes&SEARCH_NAME=bn). The closest uncultured 16S rRNA gene sequences and the closest organism 16S rRNA gene were aligned with CLUSTALX 1.83. Sequences were treated with Proseq 2.91 to homogenize sequences' length. The phylogenetic tree was constructed with 582 bp length sequences using MEGA3.1.

Nucleotide sequence accession numbers.

The sequences determined in this study have been submitted to the EMBL database and assigned Accession Nos.

RESULTS

Sediment analysis

Physico-chemical analysis of sediment was realized in the most contaminate location of the laguna (Z4). The pH of sediments in this area was 6.55. The TABLE 1 presents the results of elemental analysis C, H, O, N, S. Findings revealed a high content in carbon (25.4%), oxygen (18.7%) and nitrogen (8.4%). A significant presence of sulphur was detected (0.6%). The C:N ratio resulting from elemental analysis was 3. Cation and anion of the sediment solution (1L) containing 15g of sediments were presented in the TABLE 2. Only three cations Ca^{2+} (3.5mM), Na^+ (1.1mM), Mg^{2+} (0.42mM) and one anion Cl^- (1.7mM) were found in significant concentrations. NO_2^- , NO_3^{2-} and SO_4^{2-} were also present but in low concentrations respectively 0.2mM, 0.1mM and 0.1mM.

Bioremediation assay

Time course of nitramines and nitro aromatic compounds biodegradation assay was investigated in anaerobic conditions in presence and in absence of glucose. Results of the FIG. 2 A and FIG. 2 B showed that in absence of glucose, only HMX was degraded (20%). The HMX degradation began slowly after 15 days of culture and reached a maximum value after 45 days (Figure 2B). During HMX degradation no variation of pH was observed (data not shown).

In presence of glucose, RDX and HMX concentration remained unchanged (FIG. 2 A and FIG. 2 B), whereas Dinoterb and Dinoseb were totally degraded (FIG. 3A and FIG. 3B). Dinoseb and Dinoterb degradation started rapidly. At 30 days of culture 79% and 80% of Dinoterb and Dinoseb were respectively degraded. At 75 days of culture, pesticides were no more detected. During the time course of pesticide degradation a decrease of pH from 6.8 to 5.8 was observed. The pH slowly decreased during the 15 first days and remained constant until 75 days.

Phylogenetic analysis.

Sixty four clones were analysed from Z4 sample library by RFLP (FIG. 4 A), showing 47 different profiles. Eight restrictions profiles having two or more clones were selected for sequencing.

The clones Z4-88, Z4-40, Z4-65 and Z4-20 are related to *Geobacteriaceae* family. They represent 59 % of total analysed clones. Clone Z4-88 matches at 98% with an uncultured bacterium. The closest cultured microorganism is *Desulfobulbus mediterraneus* with 89% homology. Clones Z4-40, Z4-65 and Z4-20 have less than 98% of homology with the closest bacterium. Clones Z4-19, Z4-58 and Z4-74 belong to *Pseudomonaceae* family, and represent 32%. Clones Z4-19 and Z4-58 have 99% homology with *Pseudomonas veronii* and clone Z4-74 matches at 99% with *Pseudomonas gessardi* and *Pseudomonas putida*. Clone Z4-59 (9% of analysed clones) is related to the *Clostridiaceae* family and has less than 98% homology with the closest organism which is uncultured. The closest cultured bacterium is *Catabacter hongkongensis*, with 91% homology.

Seventy-two clones from AA4 sample library were analysed by RFLP (FIG. 4 B). We discriminated only eight different restriction profiles. Two profiles gathered 87% of clones. AA4 microflora is dominated by bacteria related to the enterobacter *Leclercia adecarboxylata*. Clones AA4-52, AA4-44, AA4-35, have 99% homology with this bacterium. *Enterobacteriaceae* family is also represented by clones AA4-67 and AA4-8 (4% of analysed clones) which match at 99% with *Enterobacter ludwigii* and by clones AA4-23 (1% clones) which have 99% homology with *Pantoea agglomerans*. *Pseudomonaceae* family is present in AA4 sample with *Pseudomonas citronellolis* which matches at 99% with the clones AA4-74 and AA4-32 (3% clones).

DISCUSSION

Physico-chemical analysis of sediments coming from an old industrial laguna revealed that these sediments can be assimilated to an industrial sludge. The high organic carbon content and the low C:N ratio equal to three, confirmed that this sludge only results from the sedimentation of wastewater during more than 50 years. Few studies have been realized on such material, mixing both herbicides and explosives compounds. In addition, the concentrations of nitramines and nitro aromatic compounds are higher than others military sites previously described (15,33). The nature and the diversity of these compounds illustrate the complexity and the originality of the material studied.

The identified bacterial populations found in Z4 sample are distributed within 3 major families: *Geobacteriaceae*, *Clostridiaceae* and *Pseudomonaceae*. *Geobacteriaceae* (clones Z4-88, Z4-40, Z4-65, and Z4-20) are anaerobes commonly found in environment especially in saturated zone as aquifers. Some representatives of this family can couple organic matter oxidation with iron oxides reduction (20, 21). This property can be used in uranium bioremediation assay (37), using organic matter oxidation to reduce uranium and change its sorption properties. It can also be used for organic contamination bioremediation, introducing iron oxides to oxidize the organic pollutants. In this study, no metal speciation has been carried out. However, in presence of metals, this reductive pathway could be linked to oxidation of nitrophenol. It has been showed that *Clostridium bifermentans* KMR-1 can degrade dinitrophenols like Dinoseb (0). Final mineralization of Dinoseb can occur with aerobes that will easily degrade the anaerobic

degradation products. *Clostridiaceae* are also implied in explosive degradation, *Clostridium sp. EDB2* is able to produce NO_2^- from RDX, HMX and CL20. The NO_2^- produced can play an important role in the recruitment of other bacteria able to increase the degradation process (5). These chemotaxis properties can be helpful in bioremediation processes. *Pseudomonaceae* is one of the predominant groups of soil microorganisms (32). It has been largely described to degrade in culture nitroaromatic compounds, particularly p-nitrophenol and TNT (1,7,101826). Studies of biodiversity of bacterial communities associated to such pollutants are scarce. To our knowledge, one rapport analysed the modification of bacteria diversity after one to eight weeks of a natural soil treated with dinoterb (9). A second study in coastal region of Oahu Island of Hawaiï, characterized the microorganisms from marine tropical sediment contaminated with low concentrations of RDX and HMX (3). This report highlights the presence of different species of marine bacteria as *Proteobacteriaceae* and Firmicutes, able to degraded RDX and HMX.

In the Laguna, the high concentrations in nitrophenols and nitramines measured 20 years after the end of production, associated with a poor global mineral content suggest a low biological activity in this sludge. Moreover, in multi-solute systems, herbicide combination implies competition for sorption sites thus it could influence biodegradation processes by modifying bioavailability to microorganisms (22). In view of the high concentration of organic compounds, for bioremediation, a significant dilution of the sludge and the addition of mineral nutrients are necessary. In order to improve biodegradation of these nitramines and nitro aromatic compounds, a source of carbon that could constitute both a co-substrate and an energy source was tested. In this aim, a Winogradsky culture medium supplied or not with glucose was selected for bioremediation assays. Culture conditions of AA4 treatment (Winogradsky culture medium + Glucose in 37°C in anaerobic conditions) permit a close-to-100% degradation of nitrophenols Dinoseb and Dinoterb (FIG. 3). In these culture conditions, no metabolite was detected in medium extraction (data not shown). Some work showed that Dinoseb could be partially degraded in 20 days with an unidentified intermediate not degraded until 200 days (28). This degradation did not occur without glucose. Two hypotheses could explain these results: (i) glucose may improve the growth of bacteria like *Enterobacter* or *Pseudomonas*, able to metabolize herbicides and (ii) glucose was used as a co substrate in nitrophenols biodegradation. In presence of glucose, a decrease of the biodiversity and the emergency of two genders of bacteria (*Enterobacter* and *Pseudomonas*) were observed. However the use of glucose as co-substrate by the bacteria to degrade herbicides at the beginning of the culture remains possible. Effectively, most of herbicides degradation studies were realized in presence of co-substrates (0,28).

After 75 days incubation, the AA4 microflora is strongly dominated by bacteria associated to *Leclercia adecarboxylata*. Either if strains of this species have been described as able to degrade polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) in aerobic conditions (31), nothing is reported about a nitrophenols degradation role of this bacterium. PAH are suitable for being degraded by *Pseudomonas citronellolis* (14). However, PAH and solvents were not detected in this sludge. *Pseudomonas citronellolis* is linked to 99% to AA4-74 clone. Despite the fact that *Pseudomonas* is indexed as an aerobic bacterium, several *Pseudomonas* species have been indexed for using nitrate or nitrite as final electron acceptor in the respiratory chain (13, 34). This metabolic pathway could explain the presence of *Pseudomonas* in anaerobic reactor. Consequently, the presence of *Pseudomonas* in anaerobic conditions as shown in figure 5 suggests the presence of nitrate or nitrite in AA4 enrichment. Z4 zone is very poor in inorganic nitrogen (TABLE 1). In

addition, Winogradsky medium is deprived of nitrogen source. In the reactor, the concentration in nitrate + nitrite was around 15 μM . This concentration appeared too low, to serve as electron acceptor for respiration. In the reactor, the only source of reducible nitrogen consists in the nitrated functions of organic contaminants. *Pseudomonas putida*, is known to degrade p-nitrophenol whatever the nitrogen sources in culture medium (18). Authors observed that the presence of glucose (0,4g/L) inhibit p-nitrophenol degradation. These results demonstrated that *Pseudomonas putida* uses p-nitrophenol as carbon and energy sources. Others studies (1, 10, 26) suggest that several *Pseudomonas* are able to use phenol cycle as energy and carbon source. Moreover, *Pseudomonas* sp. Strain JLR11, isolated from a wastewater treatment plant, is able to respire 2,4,6-Trinitrofluorene as the sole N source(7). Reduction of TNT by *Pseudomonas* sp. Strain JLR11 is linked to proton extrusion and promotes ATP synthesis (10). Authors demonstrated that the reduction of TNT to the corresponding aminonitrotoluenes is of physiological importance as an energy conservation system under anoxia. In the reactor, the two herbicides, which are nitrophenolic compounds, present the same structural nitro groups as TNT and would serve as electron acceptor in anaerobic conditions. This could be constituted the first step in Dinoseb and Dinoterb degradation. *Enterobacter agglomerans* which is phylogenetically close to *Pantoea agglomerans* (AA4-23 clones) has an azoreductase able to degrade N=N connections in azo dyes (23) but nothing is reported about an action on nitrated compounds. This bacterium is also reported as a benzene cycle LAS (Linear Alkylbenzene Sulfonate) degradant (16). These properties can be explained by the sludge complexity. Molecular condensation processes were not excluded in effluent containing Dinoseb as previously described by Kaake (15). To product nitramines and nitro aromatic compounds, sulfonates were used (19) as intermediate reaction before phenol nitration. A molecular condensation could occur during Dinoterb and Dinoseb production. The mass analysis of the sludge revealed the presence of an ion at m/z 403 which could result from 2 nitrophenols condensation (data not shown).

In conclusion, microflora composition of a successful remediation process of high concentration of pesticides has been showed in this study. However, AA4 bioremediation assay is only a static picture after 75 days of culture, and it is difficult to conclude on the chronology and on precise roles of the bacteria on the two nitrophenolic compounds degradation. Further works are necessary to determine the metabolism of each bacterium on these compounds.

Acknowledgements

This work is supported by a grant n° 03-79-144 of the Direction Générale de l'Armement (DGA, FRANCE). We wish to thanks Mr Pechoux and Mr Mericam-Bourdet from DGA agency. We would like to thank Mr Spyckerelle (EURENCO FRANCE) for his help and advices in safety.

References :

1. **Ajithkumar, B., V. P. Ajithkumar, and R. Iriye.** 2003. Degradation of 4-amyphenol and 4-hexylphenol by a new activated sludge isolate of *Pseudomonas veronii* and proposal for new subspecies status. *Res. Microbiol.* **154**:17–23.
2. **Beller, H.R., and K. Tiemer.** 2002. Use of liquid chromatography/tandem mass spectrometry to detect distinctive indicators of in situ RDX transformation in contaminated groundwater. *Environ. Sci. Technol.* **36**:2060–2066.
3. **Bhatt, M., Zhao, J.-S., Monteil-Rivera, F., and J. Hawari.** 2005. Biodegradation of cyclic nitramines by tropical marine sediment bacteria. *J. Ind. Microbiol. and Biotechnol.* **32**:261–267.
4. **Bhatt, M, J. S. Zhao, A. Halasz, and J. Hawari.** 2006. Biodegradation of hexahydro-1,3,5-trinitro-1,3,5-triazine by novel fungi isolated from unexploded ordnance contaminated marine sediment. *Int J Syst Evol Microbiol.* In press.
5. **Bhushan, B., Halasz, A., Thiboutot, S., Ampleman, G., and J. Hawari.** 2004. Chemotaxis-mediated biodegradation of cyclic nitramine explosives RDX, HMX, and CL-20 by *Clostridium* sp. EDB2. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **316**: 816–821.
6. **Binks, P. R., S. Nicklin, and N. C. Bruce.** 1995. Degradation of hexahydro-1,3,5-trinitro-1,3,5-triazine (RDX) by *Stenotrophomonas maltophilia* PB1. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**: 1318–1322.
7. **Caballero, A., A. Esteve-Núñez, G. J. Zylstra, and J. L. Ramos.** 2005. Assimilation of Nitrogen from Nitrite and Trinitrotoluene in *Pseudomonas* sp. JLR11. *J. Bacteriol.* **187**:396–399.
8. **Coleman, N. V., D. R. Nelson, and T. Duxbury.** 1998. Aerobic biodegradation of hexahydro-1,3,5-trinitro-1,3,5-triazine (RDX) as a nitrogen source by a *Rhodococcus* sp., strain DN22. *Soil Biol. Biochem.* **30**:1159–1167.
9. **Engelen, B., Meinken K., von Wintzingerode, F., Heuer, H., Malkomes, H-P., and H. Backhaus.** 1998. Monitoring Impact of a Pesticide Treatment on Bacterial Soil Communities by Metabolic and Genetic Fingerprinting in Addition to Conventional Testing Procedures. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**: 2814–2821.
10. **Esteve-Núñez, A., G. Lucchesi, B. Philipp, B. Schink, and J. L. Ramos.** 2000. Respiration of 2,4,6-Trinitrotoluene by *Pseudomonas* sp. Strain JLR11. *J. Bacteriol.* **182**:1352–1355.
11. **Fernando, T., J.A. Bumpus, and S. D. Aust.** 1990. Biodegradation of TNT (2,4,6-trinitrotoluene) by *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**:1666–1671.
12. **Hammill, T.B., and R.L. Crawford.** 1996. Degradation of 2-sec-butyl-4,6-dinitrophenol (dinoseb) by *Clostridium bifermentans* KMR-1. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**: 1842–1846.
13. **Hernandez, D., and J. J. Rowe,** 1987. Oxygen regulation of nitrate uptake in denitrifying *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl. Environ. Microbiol.* **53**:745–750.
14. **Jacques, R. J. S., E. C. Santos, F. M. Bento, M. C. R. Peralba, P. A. Selbach, E. L. S. Sá, and F. A. O. Camargo.** 2005. Anthracene biodegradation by *Pseudomonas* sp. Isolated from a petrochemical sludge landfarming site. *Int. Biodeterioration Biodegrad.* **56**:143–150.
15. **Kaake, R. H., D. J. Roberts, T. O. Stevens, R. L. Crawford, D. L. Crawford.** 1992. Bioremediation of soils contaminated with the herbicide 2-sec-butyl-4,6-dinitrophenol (dinoseb). *Appl. Environ. Microbiol.* **58**:1683–1689.

16. **Khleifat, K.M.** 2006. Biodegradation of linear alkylbenzene sulfonate by two-member facultative anaerobic bacterial consortium. *Enzyme Microbial Technol.* **39**:1030–1035.
17. **Kitts, C. L., D. P. Cunningham, and P. J. Unkefer .** 1994. Isolation of three hexahydro-1,3,5-trinitro-1,3,5-triazine-degrading species of the family Enterobacteriaceae from nitramine explosive-contaminated soil. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**:4608–4611.
18. **Kulkarni, M., and A. Chaudhari.** 2006. Biodegradation of *p*-nitrophenol by *Pseudomonas putida*. *Biores. Technol.* **97**:982–988.
19. **Leonard, J. B. Lygo and G. Procter.** 1998. Original synthesis procedure of picric acid. In [Advanced Practical Organic Chemistry](#) 3rd edition. Eds S. Thornes. pp. 171–172. CRC press. London.
20. **Lovley, D. R., J. C. Woodward, and F. H. Chapelle.** 1994. Stimulated anoxic biodegradation of aromatic hydrocarbons using Fe (III) ligands. *Nature.* **370**:128–131.
21. **Lovley, D. R., M. J. Baedeker, D. J. Lonergran, I. M. Cozarelli, E. J. P. Phillips, and D. I. Siegel.** 1989. Oxidation of aromatic contaminants coupled to microbial iron reduction. *Nature.* **339**:297–299.
22. **Martins, J.M. and A. Mermoud.** 1998. Sorption and degradation of four nitroaromatic herbicides in mono and multi-solute saturated/unsaturated soil batch systems. *J. Contam. Hydrol.* **33**:187–210.
23. **Moutaouakkil, A., Y. Zeroual, F. Z. Dzayri, M. Talbi, K. Lee, and M. Blaghen.** 2003. Purification and partial characterization of azoreductase from *Enterobacter agglomerans*. *Arch. Biochem. and Biophys.* **413**:139–146.
24. **Mukhi, S., X. Pan, G. P. Cobb, R. and Patiño.** 2005. Toxicity of hexahydro-1,3,5-trinitro-1,3,5-triazine to larval zebrafish (*Danio rerio*). *Chemosphere.* **61**:178–185.
25. **Myler, C. A. and W. Sisk.** 1991. Bioremediation of explosives contaminated soil (scientific questions/engineering realities). In *Environmental Biotechnology for Waste Treatment*, eds G. S. Sayler, R. Fox and J. W. Blackburn. pp. 137–146. Plenum Press, New-York.
26. **Nam, I. H., Y. S. Chang, H. B. Hong, and Y. E. Lee.** 2003 A novel catabolic activity of *Pseudomonas veronii* in biotransformation of pentachlorophenol. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **62**:284–290.
27. **Regan, K. M., and R. L. Crawford.** 1994. Characterization of *Clostridium bifermentans* and its biotransformation of 2,4,6-trinitrotoluene (TNT) and hexahydro-1,3,5-trinitro-1,3,5-triazine (RDX). *Biotechnol. Lett.* **16**:1081–1086.
28. **Roberts, D. J., R. H. Kaake, S. B. Funk, D. L. Crawford, and R. L. Crawford.** 1993. Anaerobic remediation of dinoseb from contaminated soil. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **39/40**:781–789.
29. **Robidoux, P. Y., J. Hawari, S. Thiboutot, G. Ampleman, and G. I. Sunahara.** 2001. Chronic toxicity of octahydro-1,3,5,7-tetranitro-1,3,5,7-tetrazocine (HMX) in soil determined using the earthworm (*Eisenia andrei*) reproduction test. *Environ. Pollut.* **111**:283–292.
30. **Robidoux, P. Y., P. Gong, M. Sarrazin, G. Bardai, L. Paquet, J. Hawari, C. Dubois, and G. I. Sunahara.** 2004. Toxicity assessment of contaminated soils from an antitank firing range. *Ecotoxicol. Environ. Safety.* **58**:300–313
31. **Sarma, P. M., D. Bhattacharya, S. Krishnan, and B. Lal.** 2004. Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by a newly discovered enteric bacterium, *Leclercia adecarboxylata*. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**:3163–3166.

32. **Schakmann, A., and R. Müller.** 1991. Reduction of nitroaromatic compounds by different *Pseudomonas* species under aerobic conditions. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **34**:809–813.
33. **Simini, M., R. T. Checkai, R. G. Kuperman, C. T. Phillips, J. E. Kolakowski, C. W. Kurnas and G. I. Sunahara.** 2003. Reproduction and survival of *Eisenia fetida* in a sandy loam soil amended with the nitro-heterocyclic explosives RDX and HMX. *Pedobiologia.* **47**:657–662.
34. **Spangler, W. J., and C. M. Gilmour.** 1966. Biochemistry of nitrate respiration in *Pseudomonas stutzeri*. *J. Bacteriol.* **91**:245–250.
35. **Talmage, S. S., D. M. Opresko, C. J. Maxwell, C. J. E. Welsh, F. M. Cretella, and P. H. Reno.** 1999. Nitroaromatic munition compounds: environmental effects and screening values. *Rev. Environ. Contam. Toxicol.* **161**:1–156.
36. **Viant, M. R., C. A. Pincetich, D. E. Hinton, and R. S. Tjeerdema.** 2006. Toxic actions of dinoseb in medaka (*Oryzias latipes*) embryos as determined by in vivo ³¹P NMR, HPLC-UV and ¹H NMR metabolomics. *Aqua. Tox.* **76**:329–342.
37. **Vrionis, H. A., R. T. Anderson, I. Ortiz-Bernad, K. R. O'Neill, C. T. Resch, A. D. Peacock, R. Dayvault, D. C. White, P. E. Long, and D. R. Lovley.** 2005. Microbiological and geochemical heterogeneity in an in situ uranium bioremediation field site. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**:6308–6318.
38. **Zhang, B., C. M. Freitag, J. E. Cañas, Q. Cheng and T. A. Anderson.** 2006. Effects of hexahydro-1,3,5-trinitro-1,3,5-triazine (RDX) metabolites on cricket (*Acheta domesticus*) survival and reproductive success. *Environ. Pollut.* **144**:540–544.
39. **Zhao, J. S., A. Halasz, L. Paquet, C. Beaulieu, and J. Hawari.** 2002. Biodegradation of Hexahydro-1,3,5-Trinitro-1,3,5-Triazine and its mononitroso derivative Hexahydro-1-Nitroso-3,5-Dinitro-1,3,5-Triazine by *Klebsiella pneumonia* strain SCZ-1 isolated from an anaerobic sludge. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**: 5336-5341.
40. **Zhao, J. S., J. Spain, J. Hawari.** 2003. Phylogenetic and metabolic diversity of hexahydro-1,3,5-trinitro-1,3,5-triazine (RDX)-transforming bacteria in strictly anaerobic mixed cultures enriched on RDX as nitrogen source. *FEMS Microbiol. Ecol.* **46**:189–196.
41. **Zhao, J.S., J. Spain, S. Thiboutot, G. Ampleman, C. Greer, and J. Hawari.** 2004. Phylogeny of cyclic nitramine-degrading psychrophilic bacteria in marine sediment and their potential role in the natural attenuation of explosives. *FEMS Microbiol. Ecol.* **49**:349–357.
42. **Zhao, J.S., D. Manno, C. Beaulieu, L. Paquet, and J. Hawari.** 2005. *Shewanella sediminis* sp. nov., a novel Na⁺-requiring and hexahydro-1,3,5-trinitro-1,3,5-triazine-degrading bacterium from marine sediment. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **55**:1511–1520.

List of figures

FIG. 1. Molecular structure of herbicides (A) and explosives (B) studied.	193
FIG. 2. Time course HPLC analyses of sample filtrate fractions in remediation culture assay. Medium without Glucose Medium supplemented with Glucose A: RDX degradation, B: HMX degradation. Error bars represent standard deviations of three separate experiments.	194
FIG. 3. Time course HPLC analyses of sample filtrate fractions in remediation culture assay. Medium without Glucose Medium supplemented with Glucose A: Dinoterb degradation, B: Dinoseb degradation. Error bars represent standard deviations of three separate experiments.	195
FIG. 4. Restriction profiles obtained with HinfI enzyme on Z4(A) and AA4(B) samples. (Clones from 1 to 40).	196
FIG. 5. Phylogenetic tree of clones isolated in Z4 and AA4 libraries and related bacteria based on 16s RNA sequences. Bar = 1 inferred base change per 100 nucleotides. Bootstrap values greater than 75% are shown at the branch points.	197

List of tables

TABLE 1. Physico-chemical analysis of sediment before bioremediation treatment. Percentage of Carbon (C), Hydrogen (H), Oxygen (O), nitrogen (N), and sulfur (S) observed in the contaminated soil.	198
TABLE 2. Physico-chemical analysis of sediment before bioremediation treatment. Cationic and Anionic content in the contaminated soil.	199
TABLE 3.	Erreur ! Signet non défini.

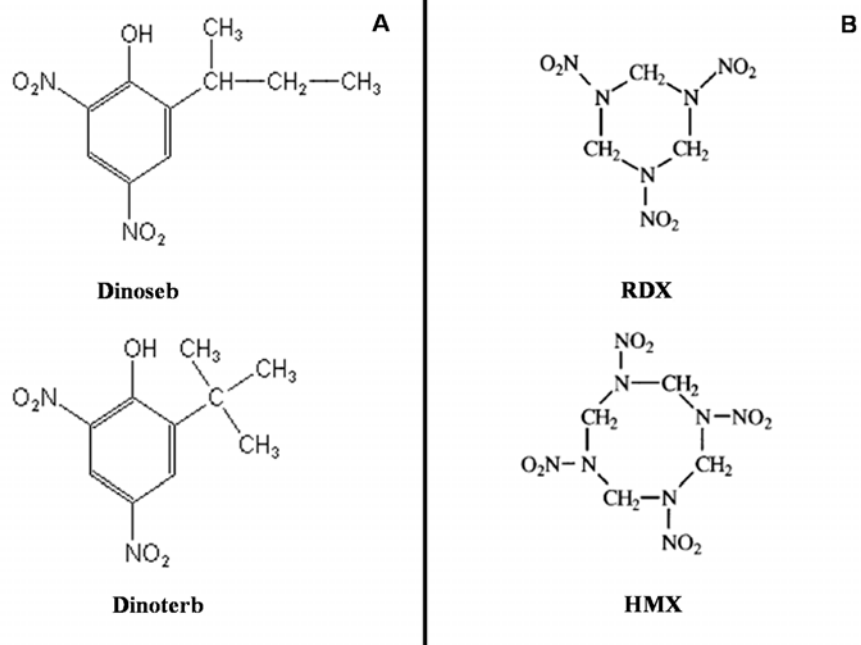


FIG. 1. Molecular structure of herbicides (A) and explosives (B) studied.

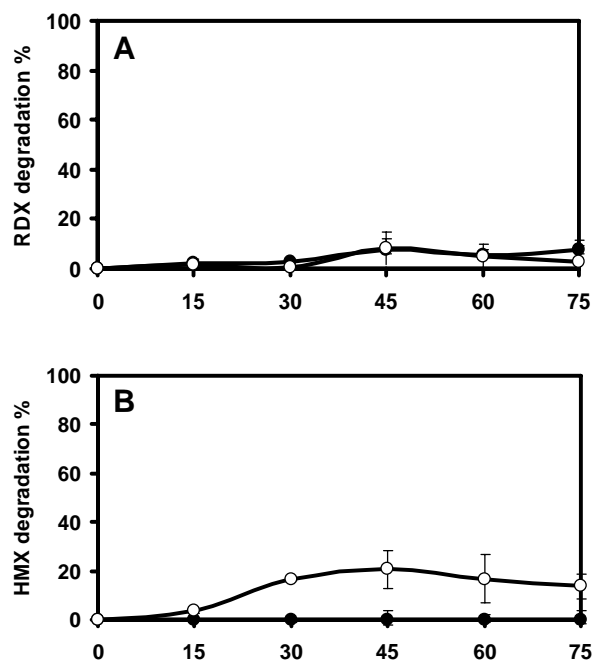


FIG. 2. Time course HPLC analyses of sample filtrate fractions in remediation culture assay. —○— Medium without Glucose —●— Medium supplemented with Glucose A: RDX degradation, B: HMX degradation. Error bars represent standard deviations of three separate experiments.

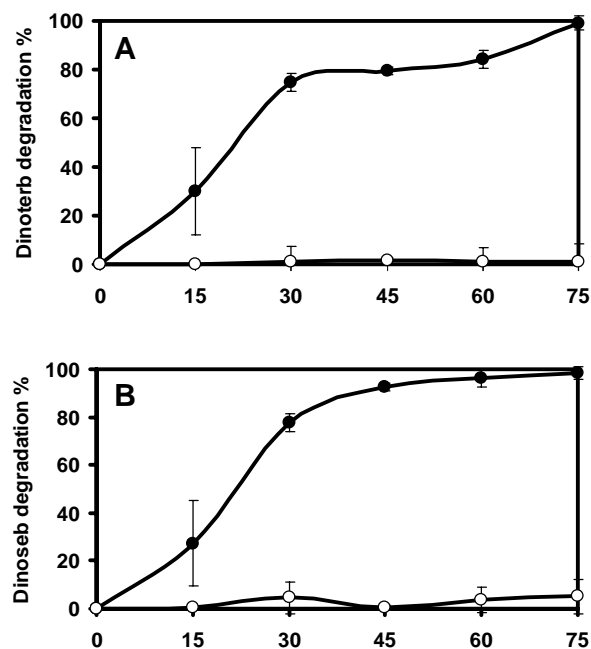


FIG. 3. Time course HPLC analyses of sample filtrate fractions in remediation culture assay. —○— Medium without Glucose —●— Medium supplemented with Glucose A: Dinoterb degradation. B: Dinoseb degradation. Error bars represent standard deviations of three separate experiments.

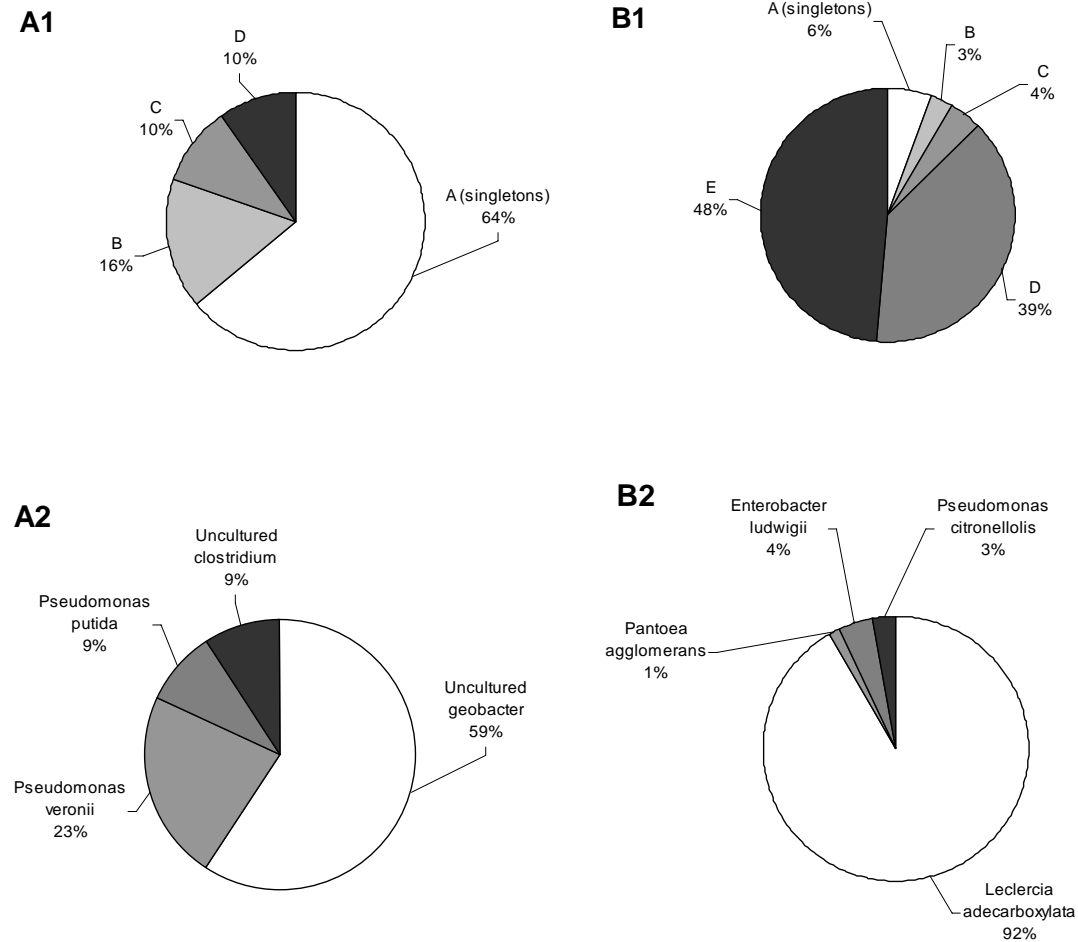


FIG. 4. Identification of representative groups of clones detected in Z4(A1=> A singletons-B : 2 representants C: 3 representants D: 6 representants)and AA4 samples(B1=> A: singletons-B: 2 representants-C: 3 representants-D:28 representants-E:35 representants). A2 and B2 shows clones of respectively Z4 and AA4 that had 2 or more representants and were sequenced

TABLE 1. Physico-chemical analysis of sediment before bioremediation treatment. Percentage of Carbon (C), Hydrogen (H), Oxygen (O), nitrogen (N), and sulfur (S) observed in the contaminated soil.

major element	%
C	25.4
H	2.4
O	18.7
N	8.4
S	0.6

TABLE 2. Physico-chemical analysis of sediment before bioremediation treatment. Cationic and Anionic content in the contaminated soil.

Cations	concentration (mM)
Na⁺	1.09
NH₄⁺	0.04
K⁺	0.02
Mg²⁺	0.42
Ca²⁺	3.50
Anions	
Cl⁻	1.7
NO₂⁻	0.2
NO₃⁻	0.1
HPO₄²⁻	0.01
SO₄²⁻	0.1

Annexe VIII : Protocole du FISH

Préparation :

Dans un premier temps, l'échantillon est prélevé et introduit dans un tube Eppendorf de 2 mL, puis complété par du formaldéhyde. (gants obligatoires)

Après 1 à 3 heures à 4°C, les tubes sont centrifugés pendant 1 mn, le paraformaldéhyde est vidé puis remplacé par du PBS 1X. Le contenu de l'eppendorf est agité, homogénéisé grâce au vortex jusqu'à dissolution totale du culot. Après une nouvelle centrifugation d'1 mn, le PBS est vidé puis remplacé par 750µL d'éthanol à 100% à froid et 750µL de PBS. Les tubes sont alors conservés à -20°C.

Application

L'échantillon est homogénéisé et 3µL sont déposés sur chaque puits de la lame. Les lames sont alors séchées au sèche-cheveux. La lame est passée dans trois bains d'alcool concentrés à 50, 80 et 98%, successivement durant 3 minutes.

Hybridation

La solution d'hybridation est préparée dans des tubes Eppendorf de 2 mL selon la composition détaillée dans le Tableau 22.

Tableau 22 : Composition de la solution tampon d'hybridation

Produit	Concentration	Volume (µL)
NaCl	5 M	360
Tris HCl	1 M	40
Formamide	100 %	400
Eau Mili Q		1198
SDS	10 %	2

Huit microlitres de solution d'hybridation sont déposés dans chaque puits. Un microlitre de sonde est ajouté dans chaque puits. Pour utiliser deux sondes en même temps, 0,5 µL de

chaque sonde est ajouté. La lame est déposée dans un tube de 50mL contenant un morceau de papier absorbant imbibé du reste de solution d'hybridation. Le tube est placé dans le four à hybridation et laissé à hybrider pendant 2 heures à 46°C.

Une solution tampon de nettoyage est alors préparée selon la composition décrite dans le Tableau 23.

Tableau 23 : Composition de la solution tampon de nettoyage

Produit	Concentration	Volume
NaCl	5 M	2150µL
Tris HCl	1 M	1 mL
Eau Mili Q		46,85mL
SDS	10 %	50 µL

La concentration finale en NaCl est choisie en fonction de la concentration en formamide de la solution d'hybridation.

Le tube est placé à préchauffer à 48°C. La lame est alors sortie du four, rincée délicatement avec la solution de tampon de nettoyage puis placée dans 50mL de solution tampon. La lame est laissée 15mn à 48 °C, rincée par de l'eau à 0°C, puis placée dans un bécher d'eau froide. La lame est séchée, 10µl de citifluor (à manipuler avec des gants) sont ajoutés à chaque puits. Les lames sont conservées à -20°C.

Observation microscopique

Les lames sont observées à l'aide du logiciel *Explora Nova Morpho Pro*. Une photo de la lame est prise à la lumière blanche. Prendre ensuite une photo avec le filtre 1 : champ microscopique rouge. Prendre une photo du même champ microscopique avec le filtre dapi (filtre 3). Les bactéries visibles distinctement sont alors comptées.

Résumé thèse

Pendant plusieurs décennies, des industries chimiques ont traité leurs effluents de synthèse en utilisant des systèmes de lagunage. La plupart du temps, les sédiments de ces lagunes sont constitués de molécules organiques de synthèse diverses et complexes. Compte tenu de la persistance des composés nitrés, ces derniers sont aujourd'hui à l'origine de la contamination potentielle des sols, des nappes phréatiques ainsi que des eaux de surface.

Ce travail présente une étude de bioremédiation d'une boue issue d'une lagune ayant reçu des effluents de synthèse d'explosifs et d'herbicides durant plusieurs décennies. Les explosifs appartiennent principalement à la famille des nitramines (RDX et HMX) et des nitro-aromatiques (TNT) tandis que les herbicides appartiennent à la famille des dinitrophénols (Dinosèbe et Dinoterbe). Tout d'abord, une caractérisation physico chimique du sédiment a permis d'évaluer les propriétés de la boue à décontaminer (pH, teneurs en carbone, en azote, ...) et d'apporter d'éventuels compléments nutritifs nécessaires à la croissance des microorganismes. Par la suite, une caractérisation microbiologique a permis d'identifier les espèces microbiennes présentes dans le sédiment et orienter ainsi les essais de bioremédiation. Ainsi des espèces répertoriées pour avoir un potentiel de dégradation (*Leclercia adecarboxylata*, *Pseudomonas citronellolis* et *Pseudomonas putida*) ont été identifiées. De plus, plusieurs nouvelles espèces ont été découvertes, dont les séquences ont été déposées sur Genbank. La mise au point d'un protocole d'extraction et d'analyse simultanées des explosifs et des herbicides ont permis d'évaluer leurs concentrations dans le sédiment et d'effectuer un suivi cinétique de ces composés sur différentes méthodes de bioremédiation. Ainsi, un premier essai de fermentation anaérobie a permis la disparition dans le réacteur de deux molécules de la famille des nitrophénols, le Dinosèbe et le Dinoterbe tandis que le RDX et le HMX n'ont pas été dégradés. Par ailleurs, des cultures pures de *Leclercia adecarboxylata*, *Pseudomonas citronellolis* et *Pseudomonas putida* ont révélé leur pouvoir de dégradation du DNTB en 5 jours. Un second procédé de réacteur mixte aéro-anaérobie a été mis au point dans le même objectif. En plus de favoriser l'alternance entre phase aérobie et anaérobie, ce réacteur a permis d'avoir une phase en anaérobie en lit fixé. L'utilisation de ce réacteur a permis de dégrader les nitrophénols et les nitramines après 105 jours de fonctionnement. L'identification des microorganismes dans le sédiment et dans les essais de bioremédiation a permis d'établir des corrélations entre les espèces bactériennes et leur rôle de dégradation de certains produits.